



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

O uso de baculovírus como ferramenta para produção de antígenos vacinais e kits diagnósticos de doenças humanas: raiva, febre amarela, dengue e zika

Capítulo I:

Expressão de um peptídeo imunogênico da glicoproteína do vírus da raiva na superfície da partícula viral de um baculovirus e seu potencial para uso como uma vacina de subunidade

Capítulo II:

Expressão da proteína de envelope do vírus da febre amarela fusionada à poliedrina de um baculovirus e sua análise como candidata a vacina recombinante

Capítulo III:

Expressão de proteínas NSI recombinantes dos vírus zika (ZIKV) e dengue (DENV-1) em células de inseto e seu uso como insumos para diagnóstico

Mayarha Patricia Dequigiovanni Baggio

Orientador: Bergmann Morais Ribeiro

Brasília
2019





**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

O uso de baculovírus como ferramenta para produção de antígenos vacinais e kits diagnósticos de doenças humanas: raiva, febre amarela, dengue e zika

Capítulo I:

Expressão de um peptídeo imunogênico da glicoproteína do vírus da raiva na superfície da partícula viral de um baculovirus e seu potencial para uso como uma vacina de subunidade

Capítulo II:

Expressão da proteína de envelope do vírus da febre amarela fusionada à poliedrina de um baculovirus e sua análise como candidata a vacina recombinante

Capítulo III:

Expressão de proteínas NS1 recombinantes de vírus zika (ZIKV) e dengue (DENV-1) em células de inseto e seu uso como insumos para diagnóstico

Mayarha Patricia Dequigiovanni Baggio

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular

Orientador: Bergmann Morais Ribeiro

Brasília
2019

Tese de autoria de Mayarha Patricia Dequigiovanni Baggio, intitulada “O uso de baculovírus como ferramenta para produção de antígenos vacinais e kits diagnósticos de doenças humanas: raiva, febre amarela, dengue e zika”, apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular da Universidade de Brasília - UnB, em 8 de Novembro de 2019, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Universidade de Brasília - UnB – Presidente

Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges

Faculdade de Medicina – Universidade de Brasília - UnB

Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília – UnB

Dra. Marlinda Lobo de Souza

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Suplente: Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares

Universidade de Brasília – UnB

Agradecimentos

A Universidade de Brasília, e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular pela oportunidade e infraestrutura, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico pelo apoio financeiro na realização do trabalho.

Ao meu companheiro Marlon, por estar ao meu lado nessa longa caminhada, sempre me apoiando e incentivando a continuar com muito respeito e amor. E principalmente, por ser Pai dedicado nas horas que não estive presente, cuidando de nosso menino Max para que eu pudesse terminar este trabalho. Eterna gratidão!

A minha família, meu Pai José, mãe Ivonete e irmã Maikelli por todo o apoio sempre que possível mesmo distante fisicamente, obrigada pelas palavras de incentivo e coragem nas horas em que mais precisei. E a minha segunda família Lucena/Branco por compreenderem minha ausência nestes últimos meses e sempre me colocarem em suas orações diárias.

Ao meu orientador, professor Bergmann, que eu tive o privilégio de ser aluna. Muito obrigada pelos riquíssimos ensinamentos de Baculovírus!

A minha co-orientadora de coração, amiga e comadre Lorena, por todos os ensinamentos repassados, por todo o apoio e ajuda de sempre, se hoje estou escrevendo estes agradecimentos com certeza devo isso a ela, que com toda calma do mundo sempre me motivou e acreditou em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava mais. Obrigada por mesmo distante fisicamente, estar presente todos os dias! Essa vitória é sua também!

Aos professores Tatsuya e Renato por sempre serem solícitos quando requisitados.

À professora Anamélia Bocca, por sua colaboração nos trabalhos de imunologia. E meu obrigada também a sua aluna Camila que nos auxiliou na realização dos experimentos imunológicos.

Ao Leonardo pela colaboração nos ensaios de Elisa na Fiocruz do Rio de Janeiro. Muito obrigada!

Ao Daniel, por me acompanhar em alguns experimentos e me dar direcionamento. Obrigada!

À todos os alunos do laboratório de Baculovírus da UnB. Quando ingressei a Brasília para realizar este doutorado, fui recebida e acolhida por todos. Meu muito obrigada! E em especial a Deborah, minha amiga, que me acolheu no primeiro mês em sua casa juntamente com sua família, obrigada tia Mimi e tia Eline! Gratidão a vocês!

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB, a todos os profissionais, as técnicas Ingrid e Shaiane, e em especial as amigas Daniela e Lorena que compartilharam seus conhecimentos de microscopia confocal.

Ao professor Aragonê, que além de ser um grande Mestre é um ser humano incrível! Em uma semana de live sobre orientação e dicas para concursos, nos revela através do relato de sua trajetória vários desafios que foram vencidos ao longo de sua vida, mostrando que todos podem vencer seus medos e chegar onde tanto almejam, e que se organizar direitinho dá para fazer e obter êxito. Você faz parte do rol das pessoas que me incentivaram e me fizeram acreditar que isso seria possível. Gratidão!

Aos amigos da vida que conquistei nesta trajetória, especialmente Ítalo e Carlos Miguel que aos 45 do segundo tempo salvam o arquivo da tese que resolve travar. Muito obrigada! A Renata, Laura, Angela, Beta, Flavinho, Igor que sempre estão disponíveis para o que der e vier, especialmente com os cuidados com o Max. E a Júlia e Dani que sempre torceram por essa conquista.

À banca avaliadora, professora Marlinda, Tatiana e Aldo pela excelente revisão deste material. Muito obrigada! E em especial, agradeço a professora Imaculada pelos riquíssimos ensinamentos sobre Imunologia, e pela atenção especial em que se dedicou a este trabalho, sempre com muita ternura e carinho. Gratidão!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta etapa importante do meu projeto de vida.

Resumo

O sistema de expressão em células de insetos utilizando baculovírus (BEVS) tem sido amplamente utilizado para uma variedade de aplicações, incluindo o uso como biopesticidas modificados, produção de proteína recombinante, expressão transitória de transgenes, e expressão de antígenos para uso vacinal ou em diagnóstico. Além da vantagem da produção de proteína heteróloga em grande escala com modificação pós-traducional eucariótica apropriada, as proteínas heterólogas também podem ser exibidas no envelope viral. Esta tecnologia de apresentação na superfície preserva a estrutura multimérica nativa da proteína, expandindo assim a utilidade clínica e farmacêutica do sistema de baculovírus. No capítulo I, deste trabalho, foi avaliado o potencial imunogênico de BVs (“*Budded virus*”) recombinantes contendo um peptídeo imunogênico derivado da GPV (Glicoproteína) do vírus da raiva fusionado à proteína GP64 do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV). A GPV interage com os receptores celulares e contém os epítopos reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes, sendo assim alvo para a produção de uma vacina de subunidade. Foi mostrado neste trabalho, a confirmação da expressão da proteína recombinante (GP64Ag + GPV) por *Western blot* e imunomarcação na microscopia confocal. No capítulo II, o sistema BEVS foi utilizado para expressar o EDIII (domínio III), da proteína de envelope do vírus da febre amarela, fusionado à proteína poliedrina de *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Foi mostrado neste trabalho, a confirmação da correta expressão da proteína recombinante (Poliedrina + EDIII) por *Western blot*, microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. As partículas virais recombinantes foram purificadas e inoculadas em camundongos. As análises imunológicas mostraram uma resposta imune específica a Th1/Th17 frente ao antígeno em camundongos após a imunização. Também foi observado que a proteína pode atuar como adjuvante durante a imunização e que desencadeia uma resposta imunológica específica. Assim este resultado sugere um possível uso deste recombinante como imunógeno. No capítulo III, foi avaliada a expressão de proteínas NS1 (proteína não-estrutural 1) recombinantes dos flavivírus Zika (ZIKV) e dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) em células de inseto e seu uso como insumos para diagnóstico através da detecção do anticorpo anti-NS1 de DENV, no plasma de pacientes infectados. A proteína NS1 é secretada e circula no plasma no início da fase febril da doença, e pacientes produzem anticorpos específicos ao NS1 de flavivírus, além de anticorpos contra proteínas estruturais. Desta forma, peptídeos imunogênicos de NS1 de DENV 1, - 2, - 3 e 4 e ZIKV foram fusionados com a proteína poliedrina de AcMNPV e suas proteínas expressas foram purificadas com Tween 20 5% e confirmadas por *Western blot*, microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Para avaliar o efeito do antígeno frente ao soro de pacientes infectados com dengue, foi utilizado o método Elisa indireto que revelou sensibilidade alta dos antígenos. Testes complementares serão necessários para sua validação, mas acredita-se que esta estratégia pode proporcionar uma melhora na diagnose e na evolução do quadro dos pacientes acometidos.

Palavras - chave: Baculovírus; EDIII; Febre amarela; Poliedrina; GP64; GPV; NS1.

Abstract

The baculovirus expression vector system (BEVS) has long been deployed for a variety of applications including for use as biopesticides, for recombinant protein production, transient transgene expression, tissue therapy, and for vaccine production. Apart from the advantage of large-scale heterologous protein production with appropriate eukaryotic post-translational modification, foreign proteins can also be displayed on the viral envelope. This surface-display technology preserves the native multimeric structure of the protein, thereby expanding the clinical and pharmaceutical utility of the baculovirus system. In Chapter I of this work, the immunogenic potential of recombinant BVs (*Budded virus*) containing an immunogenic peptide derived from the GPV (Rabies Glycoprotein) fused with the GP64 protein of the baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) was evaluated. GPV interacts with cell receptors and contains epitopes recognized by the neutralizing antibodies, being the target for the production of a subunit vaccine. It was shown in this work, the confirmation of the expression of the recombinant protein (GP64Ag + GPV) by Western blot and immune localization by confocal microscopy. In Chapter II, the expression baculovirus system was used to express the EDIII (domain III of the yellow fever envelope protein) fused to the polyhedrin protein of *Autographa californica gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Confirmed expression of the recombinant protein (Polyhedrin + EDIII) by Western blot, light microscopy and scanning electron microscopy was shown. The immunological analyses showed a specific Th1/Th17 immune response against the antigen in mice after immunization. We also analyzed that the polyhedrin protein can act as an adjuvant during the immunization and can trigger a specific immune response. This result suggests a possible use of this antigen as an immunogen. In Chapter III, the expression of recombinant NS1 (non-structural protein 1) proteins of the zika (ZIKV) and dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) in insect cells and evaluated their use as diagnostic inputs through the detection of the anti-NS1 DENV antibody in the plasma of infected patients. NS1 protein is secreted and circulates in the plasma in the early stage of the disease, and patients produce specific antibodies to flavivirus proteins, as well as antibodies against structural proteins. In this way, NS1 immunogenic peptides from DENV 1, - 2, - 3 and 4 and ZIKV were fused to the polyether protein of AcMNPV and their expressed proteins were purified with 5% Tween 20 and confirmed by Western blotting, light microscopy and electron microscopy of scanning. To evaluate the antigen effect against the serum of patients infected with dengue the indirect ELISA method was used, which revealed high antigen sensitivity. Complementary tests will be necessary for its validation, but it is believed that this strategy can provide an improvement in the diagnosis and the evolution of the patient's condition.

Key-words: Baculovirus; EDIII; Yellow fever; Polyhedrin; GP64; GPV; NS1.

Índice de figuras

Figura 1. Árvore filogenética dos quatro gêneros da família Baculoviridae.....	18
Figura 2. Partículas virais dos AlphaBV	19
Figura 3. Ciclo infeccioso dos Alphabaculovirus	21
Figura 4. Eletromicrografia do intestino de <i>Bombyx mori</i> infetado pelo BmNPV	23
Figura 5. Esquema representativo do vírus rabies.....	32
Figura 6. Ciclos epidemiológicos de raiva no Brasil.....	33
Figura 7. Esquema representativo da construção da proteína recombinante.....	38
Figura 8. Esquema representativo do plasmídeo pGEM-T-Easy-Promega.....	40
Figura 9. Esquema mostrando o sistema Bac-to-Bac (Invitrogen).....	42
Figura 10. Amplificação do fragmento de DNA codificando para o peptídeo pepGPV da GPV	46
Figura 11. Análise da confirmação da clonagem do fragmento pepGPV	47
Figura 12. Esquema representativo da confirmação do plasmídeo pFastpepGPVAg.....	48
Figura 13. Confirmação da construção do vetor de transferência pFastpepGPVAg.....	48
Figura 14. Confirmação da construção do bacmídeo recombinante BacGP64Ag-GPVpep	49
Figura 15. Confirmação da expressão de pepGPV fusionado a GP64 em células de inseto por <i>Western Blot</i>	50
Figura 16. Localização da proteína recombinante pepGPV fusionado a GP64 na superfície de células de inseto em confocal á laser	50
Figura 17. Panorama da distribuição mundial de casos de arbovírus.....	56
Figura 18. Ciclo de transmissão enzoótica	59
Figura 19. Representação da proteína E e seus domínios	62
Figura 20. Esquema representativo de imunização de camundongos	70
Figura 21. Esquema representativo da confirmação do plasmídeo v6xhisPolh-EDIIIYF	74
Figura 22. Análise da infecção do baculovírus recombinante em microscópio óptico	75
Figura 23. Análise da proliferação de esplenócitos testados com diferentes estímulos.....	77
Figura 24. Análise da dosagem de IgG1 e IgG2a do soro de camundongos.....	78
Figura 25. Análise da dosagem de IL17 e IFN- γ	79
Figura 26. Análise da dosagem de TNF- α	80
Figura 27. Esquema representativo das proteínas virais	91

Figura 28. Mapa representativo do plasmídeo PF B1-6xHis-AcPH	97
Figura 29. Esquema mostrano o sistema Bac-to-Bac da Invitrogen	100
Figura 30. Esquema representativo das fusões do gene da poliedrina (<i>polh</i>) de AcMNPV com parte dos genes dos peptídeos da proteína NS1 dos vírus DENV 1-4 e ZIKV.....	107
Figura 31. Amplificação de fragmentos de DNA correspondentes do gene NS1 dos APDENV 1-4 e ZIKV	108
Figura 32. Confirmação da clonagem dos fragmentos dos genes NS1 de DENV 1-4 e ZIKV no vetor de clonagem pGEMT Easy (Promega).....	109
Figura 33. Confirmação da clonagem dos fragmentos de DNA referentes aos peptídeos AP de NS1 no vetor de transferência pFB1-6xhis-AcPH	109
Figura 34. Confirmação da construção dos bacmídeos recombinantes.....	110
Figura 35. Análise estrutural da infecção de células de inseto Tn5B com os baculovírus recombinantes (vAcAPDENV 1-4 e vAcAPZIKV) em microscópio de luz após 72 h.p.i..	111
Figura 36. Confirmação da expressão das proteínas recombinantes por <i>Western Blot</i>	112
Figura 37. Eletroforese de gel SDS PAGE 12% da purificação dos APDENV 1-4 usando diferentes detergentes	113
Figura 38. Eletroforese de gel de SDS PAGE 12% de proteínas purificadas de APDENV 1-4 e Zikv com Tween 20 5%	114
Figura 39. Análise de microscopia eletrônica de Varredura (MEV) dos corpos de oclusão derivados das fusões dos peptídeos APDENV 1-4 e APZIKV com a proteína poliedrina .	115
Figura 40. Análise de ELISA indireto dos peptídeos APDENV 1-4 isoladamente	118

Índice de tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no trabalho	39
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados no trabalho para amplificação dos peptídeos de NS1 de APDENV 1-4 e ZIKV.....	98
Tabela 3. Diferentes detergentes e concentrações usadas para determinar melhor purificação dos peptídeos AP de DENV	103

Abreviaturas e símbolos

6xHis	Cauda de hexa-histidina
g	Velocidade de sedimentação gravitacional
AcMNPV	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i>
AlphaBV	Alphabaculovirus
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
Beta	Betabaculovírus
BEVS	Sistema de expressão de Baculovirus
BSA	Albumina sérica bovina
BV	<i>Budded virus</i>
cDNA	DNA complementar
CDC	Controle e Prevenção de Doenças
DENV	Vírus da dengue
dNTP	Deoxinucleotídeos
DNA	Ácido desoxirribonucleico trisfosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EDIII	Domínio III da proteína de envelope
FA	Febre amarela
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
g	Grama
h	Hora
HÁ	Hemaglutinina
HaNPV	<i>Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus</i>
h p.i.	Horas após infecção
HCl	Ácido clorídrico
HIV	“ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ”
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodaltons
M	Molar: mol/L
MW	Peso molecular
mg	Miligrama = 10^{-6} grama

min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MNPV	Fenótipo múltiplo
m.o.i	<i>Multiplicity of infection</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OB	<i>Occlusion body</i>
ODV	<i>Occluded-derived virus</i>
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
ng	Nano grama
POHL	Poliedrina
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PTA	Ácido fosfotúngstico
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
s	Segundo
SNPV	Fenótipo único
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TN5B	Células <i>trichoplusia ni</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade enzimática
VLP	Partícula semelhante a vírus
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosídeo
YFV	<i>Yellow fever virus</i> - vírus da febre amarela
µg	Micrograma
µl	Microlitro

° C Grau Celsius
Zikv Doença causada pelo vírus Zika

Índice

Agradecimentos	2
Resumo	4
Abstract.....	5
Índice de figuras	6
Índice de tabelas	8
Abreviaturas e símbolos	9
Índice.....	12
Considerações Iniciais	16
Introdução geral	17
1. Taxonomia e ciclo de infecção de baculovírus.....	17
2. A importância da expressão gênica	23
3. Baculovírus como vetor de expressão heteróloga	24
4. Transdução de baculovírus em células de mamíferos	27
5. Baculovírus e capacidades imunoestimulatórias	28
Capítulo I - Expressão de um peptídeo imunogênico da glicoproteína do vírus da raiva na superfície da partícula viral de um baculovirus	30
1. Vírus da Raiva	30
2. Objetivo	36
2.1. Geral	36
2.2. Metas	36
3. Material e Métodos	36
3.1. Células e Vírus	36
3.2. Bactérias e plasmídeos	36
3.3. Construção do vetor de transferência contendo a sequência nucleotídica de um peptídeo neutralizante da proteína GPV do vírus da Raiva.....	37
3.4. Obtenção de baculovírus recombinantes	42
3.5. Purificação de partículas virais recombinantes (BVs) a partir de células infectadas pelo vírus recombinante.....	44
3.6. Análise da expressão do peptídeo do vírus da raiva por SDS PAGE e <i>Western Blott</i>	44
3.7. Análise por microscopia confocal de Varredura à laser	45

4. Resultados	46
4.1. Amplificação do fragmento pepGPV por PCR	46
4.2. Construção do plasmídeo pGEMpepGPV	46
4.3. Obtenção do plasmídeo pFastBacGP64-GPVpep	47
4.4. Construção do baculovírus recombinante contendo o fragmento pepGPV e confirmação da expressão da proteína	49
4.5. Análise por microscopia confocal de Varredura à Laser.....	50
5. Discussão	51
Capítulo II – Expressão da proteína de envelope do vírus da febre amarela fusionado a poliedrina de um baculovírus e sua análise como candidata a vacina recombinante.....	55
1. Arbovírus	55
1.1. Gênero flavivírus	57
1.2. Febre amarela	58
3. Objetivo	63
3.1. Metas	63
4. Material e Métodos	64
4.1. Vírus e células	64
4.2. Construção do vetor de transferência contendo o cassete gênico EDIII fusionado ao gene da poliedrina.....	64
4.3. Construção e titulação do vírus recombinante contendo a proteína EDIII da FA, fusionada à proteína do corpo de oclusão (poliedrina) de baculovírus	66
4.4. Análise da expressão da proteína recombinante.....	67
4.4.1. SDS PAGE e <i>Western Blott</i>	67
4.5. Purificação das proteínas recombinantes.....	68
4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	69
4.7. Imunização dos camundongos.....	69
4.8. Teste de proliferação de esplenócitos	70
4.9. Análise de concentração de Ig1 e Ig2a	71
4.10. Análise dos níveis de citocina	72
5. Resultados	72
5.1. Confirmação da expressão de 6xhis-Polh e 6xHis-PolhEDIIIYF usando BEVS.....	72
5.2. Análise estrutural e ultraestrutural de células infectadas e corpos de oclusão	74

5.3. Imunização dos camundongos e análise da proliferação dos esplenócitos	76
5.4. Produção de IgG1 e IgG2a em camundongos imunizados.....	77
5.5. Análise e resposta imune	77
6. Discussão	80
Capítulo III – Expressão de proteínas NS1 recombinantes de flavivírus em células de inseto e seu uso como insumos para diagnóstico.....	85
1. Arboviroses emergentes – Dengue e zika.....	85
2. Objetivo	95
2.1. Metas	95
3. Material e Métodos.....	96
3.1. Vírus	96
3.2. Extração de RNA viral	96
3.3. Construção dos baculovírus recombinantes	97
3.4. Amplificação de fragmentos de DNA contendo os genes NS1 dos peptídeos dos diferentes sorotipos de DENV	97
3.4.1. RT-PCR	97
3.4.2. PCR.....	97
3.5. Clonagem dos fragmentos obtidos na PCR no vetor pGEM T easy Vector.....	98
3.6. Clonagem dos fragmentos no vetor de transferência codificando os peptídeos do gene NS1	99
3.7. Construção dos baculovirus recombinantes	100
3.8. Análise de expressão das proteínas recombinantes	102
3.9. Teste de purificação das proteínas recombinantes (AP-DENV1, AP-DENV2, AP-DENV3 e AP-DENV4)	103
3.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos cristais obtidos da purificação dos AP de NS1 de DENV e ZIKV.....	104
3.11. ELISA indireto dos peptídeos recombinantes de NS1 de DENV	104
4. Resultados	106
4.1. Amplificação dos peptídeos de NS1 de DENV 1-4 e ZIKV	106
4.2. Confirmação da clonagem no vetor pGEM T easy	108
4.3. Confirmação da clonagem nos vetores de transferência	108
4.4. Confirmação dos baculovirus recombinantes.....	109
4.5. Confirmação da expressão das proteínas recombinantes	110

4.6. Purificação das proteínas recombinantes com diferentes detergentes.....	114
4.7. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	115
4.8. ELISA indireto	116
5. Discussão	119
Considerações Finais	125
Referências Bibliográficas	126
Anexo	155
Manuscrito do artigo científico.....	155

Considerações Iniciais

Devido à variedade de assuntos que abordamos neste trabalho, esta tese foi organizada em capítulos, a fim de permitir a leitura mais fluida. Inicialmente foi realizada uma introdução geral sobre o sistema BEVS de expressão utilizado em todos os capítulos com revisão de literatura científica referente a esse método. Posteriormente, dividimos os temas abordados em capítulos. Sendo assim, o Capítulo I aborda a expressão da glicoproteína da raiva na superfície da partícula viral do baculovírus AcMNPV no intuito de desenvolver insumos para uma vacina de subunidade. O capítulo II, baseia-se na expressão da proteína EDIII de febre amarela fusionada à poliedrina do baculovírus AcMNPV para realização de testes imunológicos que possibilitem a produção de uma vacina de subunidade, com características inovadoras, apresentando o trabalho intitulado: Mice immunization with yellow fever virus envelope protein domain III fused to AcMNPV baculovirus polyhedrin elicits a Th1 immune response *in vivo*, que será submetido para publicação. E o capítulo III, trata da expressão de proteínas NS1 e peptídeos imunogênicos de dengue e zika fusionados ao baculovirus AcMNPV para desenvolvimento de kits de diagnósticos. Finalizamos a tese apresentando as considerações finais.

Introdução geral

1. Taxonomia e ciclo de infecção de baculovírus

Baculovírus são vírus de insetos com características e especificidades que permitem seu uso no controle biológico de insetos-praga pois são específicos a uma ou poucas espécies relacionadas, uma alternativa a inseticidas químicos, na expressão de proteínas heterólogas destinadas à pesquisa básica e aplicada e como possíveis vetores em terapia gênica como agentes de entrega de gene *in vivo* e aplicações *ex vivo* (medicina regenerativa e transdução de células tronco) (Raty *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2015; Rohrmann, 2011). No Brasil, os baculovírus AgMNPV (*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*), HearNPV (*Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus*) SfMNPV (*Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*); CoveMNPV (*Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus*) são alguns dos vírus utilizados comercialmente no controle biológico de pragas agrícolas (Haase; Sciocco-Cap; Romanowski, 2015).

Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*, que é composta por vírus que infectam mais de setecentas espécies de insetos, os quais pertencem às ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera, sendo 90% dos vírus conhecidos isolado de organismos da ordem Lepidoptera (Jehle *et al.*, 2006).

Taxonomicamente, os baculovírus cujo genoma apresenta tamanho acima de 80 mil pares de base (pb) são divididos em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* (nucleopoliedrovírus (NPV) específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (granulovírus (GV) específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (nucleopoliedrovírus (NPV) específicos de himenópteros) e *Deltabaculovirus* (nucleopoliedrovírus (NPV) específicos de dípteros) (ICTV, 2012; Jehle *et al.*, 2006) (Figura 1.)

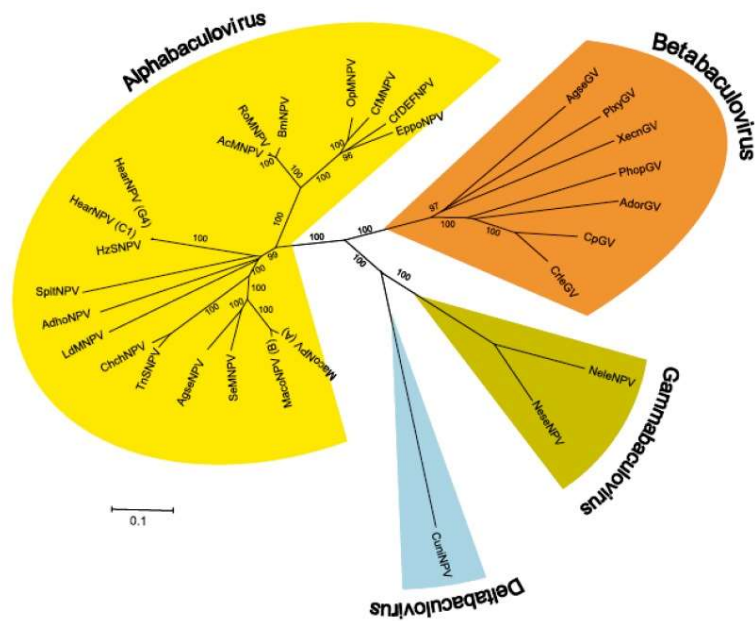


Figura 1. Árvore filogenética dos quatro gêneros da família Baculoviridae, baseado no alinhamento de 29 genes comuns indentificados em 29 genomas de baculovirus sequenciados (Jehle, 2006).

Alphabaculovirus (AlphaBV) e *Betabaculovirus* são os vírus que se apresentam em maior quantidade em relação aos outros gêneros, além de serem os mais estudados e utilizados comercialmente (Grzywacz, 2016). Estes grupos são constituídos por ácido desoxiribonucleico (DNA) circular fita dupla (Ikeda *et al.*, 2013; Rohrmann, 2011), o qual se associa com proteínas do capsídeo constituindo o nucleocapsídeo, que pode ser, individualmente (simples) ou com mais de um nucleocapsídeo (múltiplo), envolto por um envelope membranoso, formando o nucleocapsídeo envelopado ou vírion que o tamanho varia de 230 a 385 nm de comprimento e 40 a 60 nm de largura em forma de bastão. Nos AlphaBVs, vários nucleocapsídeos são agrupados em um corpo de oclusão protéico, também chamado de poliedro ou do inglês, *occlusion body* (OB), cujo tamanho varia de 0,15 a 3 μm de diâmetro (Jehle *et al.*, 2006). O poliedro confere proteção aos vírions, em especial, contra as condições adversas do meio ambiente (Hori *et al.*, 2013; Jehle *et al.*, 2006).

Uma das principais características dos baculovírus é a produção de duas formas fenotipicamente distintas nos aspectos morfológicos, composição protéica, origem dos envelopes virais, forma de penetração na célula hospedeira e infectividade; mas genotipicamente idênticas: a forma *occlusion derived virus* (ODV), ou vírus derivado da oclusão ou poliedro; e a forma *budded viruses* (BV) ou vírus brotado (Rohrmann, 2013). Nos OB um ou vários ODV estão imersos em uma matriz proteica cristalina. Estes vírions ocluídos

são responsáveis pela transmissão horizontal e atuam na infecção primária das células do epitélio do intestino médio do inseto. Os BV não se apresentam ocluídos e são responsáveis pelo estabelecimento da infecção sistêmica ou secundária, ou seja, transmissão célula-a-célula (Rohrmann, 2013) (Figura 2.) O mecanismo de envelopamento de um virion na forma simples (*single nucleopolyhedrovirus*) (SNPV) ou mais de um (*multiple nucleopolyhedrovirus*) (MNPV) ainda não foi definido, mas sabe-se que depende da espécie viral. Outro fato importante relacionado aos fenótipos é a existência de variabilidade genética para NPVs da mesma espécie, mas de diferentes localidades geográficas que afetam sua virulência (Fan *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2013; Rohrmann, 2013). Como também a passagem seriada do inóculo para replicação viral em laboratório. Em vários sistemas de células/vírus, após várias passagens para replicação viral o resultado é a redução do processo de oclusão e a perda da virulência pela diminuição de vírions ocluídos, como também acúmulo de partículas interferentes defeituosas (DIP) (Giri *et al.*, 2012). Genes como o fp25k, importantes para a formação dos poliedros no estágio final da infecção, foram identificados sofrendo e acumulando mutações rapidamente durante passagens seriadas de NPVs, resultando na formação de poliedros mutantes que predominam no inóculo viral (Krell, 1996; Moscardi *et al.*, 2011), gerando uma limitação importante para produção de baculovírus em larga escala em cultura de células de insetos (Giri *et al.*, 2012).

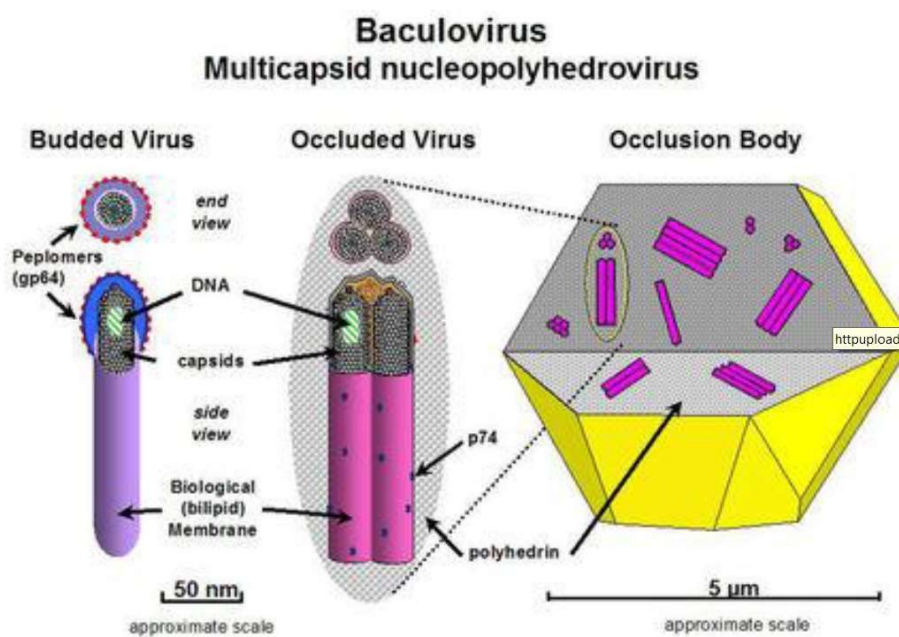


Figura 2. Partículas vírais dos AlphaBV. Os vírus derivados da oclusão (*occlusion derived virus*, ODV) estão ocluídos numa matriz cristalina, formando os OB (*occlusion bodies*), os ODVs, são responsáveis pela transmissão horizontal e infecção das células do intestino médio. Já os BVs (*budded virus*) não se

apresentam ocluídos e são responsáveis pela infecção secundária ou transmissão célula-a-célula (Braconi, 2013).

A replicação dos baculovírus caracteriza-se pela produção dos dois tipos de progênes infecciosas, citados anteriormente, apresentando funções diferentes, porém necessárias para a sua propagação natural. O ciclo de infecção na natureza inicia quando o inseto se alimenta de partes de planta contaminada com os OB presente no meio ambiente. Os nucleocapsídeos envelopados (vírions), presentes na matriz cristalina dos OB, são liberados quando submetidos ao pH alcalino do intestino médio (9,5 a 11,5) que ajuda na quebra da membrana peritrófica, a qual é composta de quitina, proteínas e glicoproteínas. O seu rompimento total acontece pelo atrito com o alimento ou por ação de proteínas (metaloproteínases e quitinases) que estão presentes nos OB de alguns baculovirus e são liberadas junto com o ODV no intestino (Lepore; Roelvink; Granados, 1996; Li *et al.*, 2003; Peng; Zhong; Granados, 1999), e finalmente, estes virions, penetram nas células epiteliais colunares, via fusão de membranas, devido a presença das proteínas no envelope do ODV que interagem com proteínas da membrana celular e medeiam a fusão do envelope viral com a membrana celular (Kikhno *et al.*, 2002) promovendo, assim, a infecção primária. Os ODV podem, através de filamentos de actina, atravessarem os poros nucleares e se instalarem no núcleo, para iniciar a replicação viral. Conforme os mRNAs são sintetizados, eles são enviados para o citoplasma onde as proteínas virais serão produzidas e endereçadas para regiões próprias, por exemplo, proteínas que farão parte do envelope dos BV serão endereçadas para a membrana celular, as proteínas envolvidas na montagem do capsídeo serão endereçadas para o núcleo. E com isso, novos genes virais são expressos e com a replicação do DNA viral, novas progênes virais são montadas e liberadas, na forma de BV, na região basolateral da célula. Os BV alcançam desta forma, a hemolinfa e sistema traqueal e dispersam a infecção no corpo do inseto, estabelecendo a infecção secundária (Figura 3.) (Adams; McClintock, 1991; Brancalhão; Torquato; Castro, 2002; Lima, 2013).

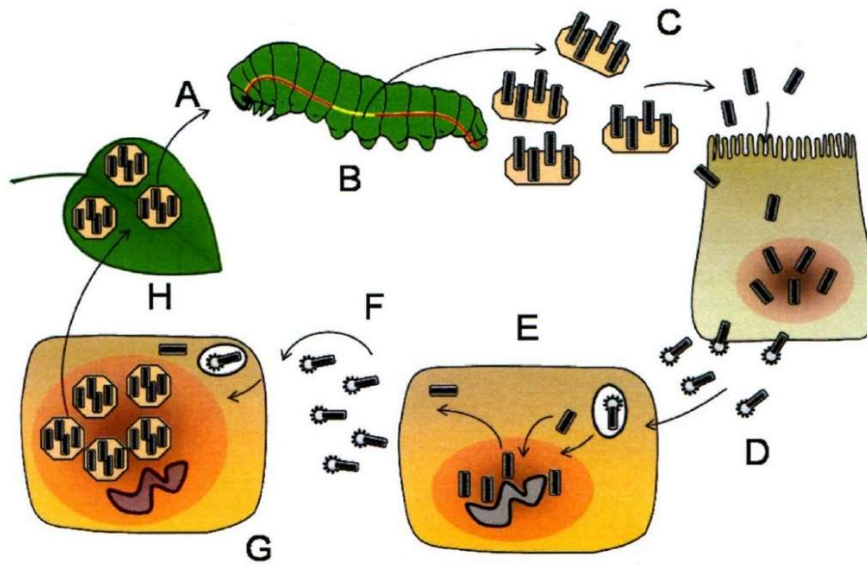


Figura 3. Ciclo infeccioso dos *Alphabaculovirus*. Em A, folhas contendo OB de um *Alphabaculovirus*. Em B, lagarta ingerindo folhas contaminadas com OB de um *Alphabaculovirus*. Em C, D e E, o poliedro é dissolvido pela ação do pH alcalino e de enzimas do suco digestivo no intestino médio do inseto, liberando assim, os ODV que atingem as células colunares e promovem a infecção primária. Em seguida, os vírions se replicam no núcleo das células e brotam na forma de BV, atingindo a hemolinfa e a traquéia infectando outras células alvos, caracterizando a infecção secundária. Após, em F, G e H, os BV se ocluem novamente no corpo de oclusão, que são liberados no ambiente, tornando-se fonte de infecção para outras lagartas (Rychlowska *et al.*, 2011).

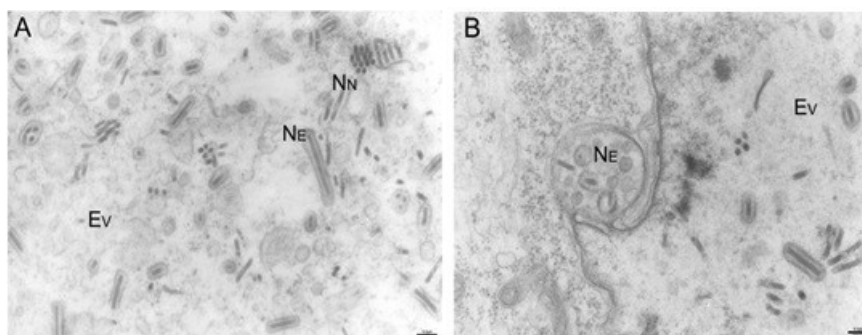
Durante a infecção, o inseto fica debilitado, perdendo sua capacidade motora de alimentação. Ocorre também o clareamento da epiderme, devido ao acúmulo de vírus no núcleo das células epidermais e adiposas, além de afetar o desenvolvimento da larva, detendo o seu crescimento (Federici, 1997). Quando a larva do inseto infectada pelo vírus morre, o seu tegumento se desintegra facilmente, liberando grande quantidade de OB no meio ambiente, servindo de inóculo para infectar outros insetos hospedeiros (Ribeiro *et al.*, 2015; Vessaro-Silva *et al.*, 2014).

Em células de inseto em cultura (*in vitro*), a infecção é iniciada por BV que entram nas células via endocitose adsorptiva. Já os ODV entram nas células por fusão direta de membranas. As proteínas responsáveis por mediar o processo de penetração dos BV nas células são as proteínas GP64 ou proteína F, dependendo do gênero do baculovirus. Essas proteínas se encontram na região peplomérica dos vírions, a qual promove a fusão da membrana endossomal com o envelope viral, liberando os nucleocapsídeos no citoplasma da célula (Ardisson-Araújo *et al.*, 2015; Blissard, 1996; Monsma; Oomens; Blissard, 1996).

A distribuição de GP64 na membrana de células epiteliais do intestino médio de *Trichoplusia ni* se dá na porção basal. Essa distribuição polar de GP64 garante que os BV

brotem apenas para o lado voltado para a lâmina basal e não para o lúmen do intestino o que não é observada em outras células de outros tecidos (Keddie; Aponte; Volkmann, 1989). Para chegar aos demais tecidos o vírus precisa atravessar a lâmina basal, uma estrutura composta principalmente por glicoproteínas que atua como uma barreira contra infecções. Foi mostrado para alguns insetos que as células da traqueia atravessam a lâmina basal em alguns pontos, e é possível que os BV utilizem essas projeções para iniciar o espalhamento sistêmico (Engelhard *et al.*, 1994). Além disso, alguns baculovirus codificam proteínas que degradam a lâmina basal, o que permite que os BV a atravessem chegando à hemolinfa (Detvisitsakun *et al.*, 2005; Means; Passarelli, 2010).

Uma célula de inseto infectada por baculovírus apresenta mudança brusca na morfologia, na qual primeiramente surge uma estrutura eletrodensa na área central do núcleo, o viroplasma ou estroma virogênico, local no qual são produzidos os nucleocapsídeos, constituídos pelo DNA viral e proteínas do capsídeo. Posteriormente, estes são envoltos por um envoltório membranoso, originado possivelmente de microvesículas oriundas da membrana nuclear interna, constituindo os nucleocapsídeos envelopados ou vírions. No citoplasma celular inicia-se a produção de proteínas envolvidas na formação do OB (poliedrina, POHL e polipeptídeo fibroso de 10 kDa - P10), sendo a poliedrina acumulada no núcleo, na região entre o viroplasma e o envoltório nuclear e a P10 acumulada tanto no núcleo como citoplasma. Os vírions se agrupam concentricamente ao redor da poliedrina, originando os OB que se acumulam no interior do núcleo ocasionando a hipertrofia nuclear. Estes são liberados da célula, através de citólise, graças a ação da proteína viral P10 (Williams *et al.*, 1989). Assim, os OB são liberados no meio extracelular, alcançando a hemocele e o lúmen intestinal conforme figura 4. (Rohrmann, 2013; Baggio *et al.*, 2014; Vessaro-Silva *et al.*, 2019).



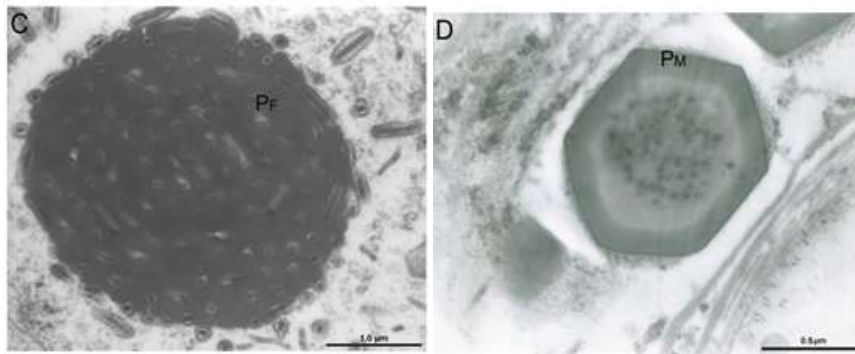


Figura 4. Eletromicrografia do intestino médio de *Bombyx mori* infectado pelo BmNPV no 7 d. p.i. Em A, estroma virogênico (Ev), nucleocapsídeos envelopados (Ne) e nucleocapsídeos não envelopados (Nn). Em B, estroma virogênico (Ev) e nucleocapsídeo envelopado (Ne). Em C, poliedro em formação (Pf). Em D, poliedro maduro (Pm) (Vessaro-Silva *et al.*, 2019).

2. A importância da expressão gênica

Uma vez iniciado o processo de infecção, a expressão dos genes de baculovirus é temporalmente e ordenada, em cascata, indicando um controle em nível transcricional, no qual os genes expressos em classe temporal anterior regulam os genes expressos na fase subsequente (Ribeiro *et al.*, 2015). Estes podem ser classificados de acordo com o tempo em que são expressos em genes precoce, tardios e muito tardios (do inglês, *early*, *late*, e *very late*). Os genes da fase precoce são transcritos pela RNA polimerase do próprio hospedeiro e possuem regiões promotoras a montante à região codificadora que são reconhecidas por fatores de transcrição celulares, revisto por Rohrmann, (2013).

A expressão gênica viral na fase precoce (*early*), desencadeia eventos que precedem a replicação do DNA viral e na fase tardia (*late*), ocorre a expressão de genes pós-replicação do DNA viral (Blissard; Rohrmann, 1990). Essas fases podem ser subdivididas em fase precoce imediata (*immediately early*) na qual os genes são expressos nas primeiras horas de infecção que corresponde a fatores de transcrição, como também a proteínas pertencentes à maquinaria de replicação viral, e fase muito tardia (*very late*), que são os genes expressos após 18 horas de infecção. Quando o DNA viral começa a ser replicado, inicia-se a fase tardia, com produção de proteínas responsáveis pela montagem de BV, de 18-24 h pós-infecção (Ribeiro *et al.*, 2015). Na última fase de infecção, a poliedrina de aproximadamente 30 KDa é produzida no núcleo das células infectadas, é a principal constituinte do OB onde compreende mais de 95% de todas as proteínas (Rohrmann, 1986). A poliedrina é altamente expressa durante a infecção viral e não é essencial para replicação viral. Desta forma, a região no genoma viral que corresponde

ao gene da poliedrina é utilizada para a construção de baculovírus recombinantes para expressão de proteínas heterólogas (O'Reilly; Miller; Luckow, 1992).

3. Baculovírus como vetor de expressão heteróloga

Sistemas de expressão usando vetores derivados de baculovírus (BEVS) têm sido usados para produzir proteínas de interesse agrônômico, médico e para pesquisa básica, durante a infecção de larvas ou cultura estabelecida de células de inseto. Historicamente, uma das mais vantajosas características do sistema de expressão em baculovírus é o fato das proteínas serem processadas em células de eucariotos. E entre outras grandes vantagens está a produção de proteínas biologicamente ativas em grandes quantidades, a custos baixos se comparado com os sistemas de expressão em células de mamíferos; excelentes candidatos a vetores de terapia gênica por serem capazes de promover infecção e incapazes de se replicar em células de mamíferos (Liu; DeCarolis; Beek, 2007; O'Reilly *et al.*, 1992).

O sistema BEVS baseia-se na inserção de genes de interesse no genoma de um baculovírus sob o comando de um promotor forte. Este pode ser o promotor do gene da proteína poliedrina (*polh*), que é a principal proteína presente nos OB ou o gene *p10* (gene da proteína fibrosa de 10 kDa dos baculovírus), expresso em fases tardias da infecção e envolvido na formação dos OB. Esses promotores são geralmente escolhidos devido à sua alta atividade de transcrição nas células de inseto em momentos tardios da infecção. As proteínas poliedrina e P10 podem representar mais de 50% das proteínas totais produzidas por uma célula infectada (Datal; Bentley; Cha, 2005). Desta forma, este sistema tem sido considerado importante fonte para produção de glicoproteínas recombinantes, visto que estas são corretamente dobradas e pós-transducionalmente modificadas pela fosforilação e glicosilação (Jarvis, 2003).

Diante disso, muitos vetores foram desenvolvidos para expressão de proteínas heterólogas em células de inseto e alguns desses são capazes de incorporar uma proteína heteróloga ao corpo de oclusão pela fusão do gene de interesse ao gene *polh*, além de manter o gene *polh* selvagem (Je *et al.*, 2003). O primeiro estudo a empregar esta estratégia foi na década de 1980, para produção do fator de crescimento semelhante a insulina (*insulin-like growth factor II* – IGF II) usando a porção aminoterminal da poliedrina do baculovírus *Bombyx mori* NPV em fusão com o peptídeo de interesse. Foi obtido um rendimento de 3,6 mg de proteína de fusão por larva e 0,3 mg por mL em cultura de células da linhagem BmN (Ribeiro *et al.*, 2015). Em estudo de Ardisson-Araújo e colaboradores (2013), foi realizado a construção de

uma proteína de fusão que foi eficientemente expressa em células de inseto, através da fusão da proteína de capsídeo do *Garlic Mite-borne Filamentous Virus* (GarMbFV) à poliedrina do baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e usadas como insumo para diagnóstico desse vírus de alho. Barros (2011), no entanto, construiu um baculovírus recombinante contendo o gene da glicoproteína G do envelope do vírus da raiva fusionado à região 3' do gene da poliedrina. O baculovírus recombinante foi capaz de expressar a proteína recombinante em insetos infectados e os corpos de oclusão construídos foram purificados parcialmente por centrifugação em gradiente de sacarose. Entretanto, os corpos de oclusão não possuíam forma definida e não foi possível uma purificação livre de contaminantes.

Contudo, o sistema BEVS foi e está sendo usado como uma alternativa para produção de antígenos de diferentes patógenos com finalidade vacinal e de diagnóstico, para humanos e uso veterinário. Entre as vacinas aprovadas estão, a vacina humana Cervarix (*human papilloma virus* - HPV) contra câncer do colo do útero, é composta de proteínas do capsídeo L1 de HPV dos tipos 16 e 18, sob a forma de VLP (*virus-like particle*) que são partículas de vírus de interesse, livres de material genético e portanto não infectivas, que mesmo produzidas pelo sistema BEVS, em células de inseto, podem ter o formato e a imunogenicidade de vacinas completas inativadas do mesmo vírus. Esta foi a primeira proteína terapêutica aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 2009 utilizando baculovírus como vetores de expressão (Mena; Kamen, 2011). O segundo produto foi o Provenge, utilizado para terapia de câncer de próstata autólogo para o qual o antígeno de superfície do antígeno da próstata (*prostate specific antigen* – PSA) é produzido em células de *Spodoptera frugiperda* (Ribeiro *et al.*, 2015). A vacina contra Peste Suína (Bayovac Csf E2tm e Porcilis Pestitm) produzidas partir da expressão da glicoproteína E2 CSFV (*classical swine fever virus*). E a vacina Flublok, que ao contrário das vacinas existentes contra a gripe, não usa o vírus influenza e nem ovos na produção. A Flublok contém três proteínas hemaglutinina (HA) recombinantes que atuam na proteção contra duas cepas de vírus influenza A, H1N1 e H3N2, e uma cepa do vírus influenza B foi aprovada pela FDA em 2013 (Goldenberg, 2013).

Além disso, várias pesquisas vêm direcionando o uso do sistema BEVS na produção de kits de diagnóstico através da expressão de proteínas recombinantes de interesse médico, como os capsídeos virais das proteínas VPX e VP3 do birnavírus causador da doença da bursite infecciosa (IBD '*infectious bursal disease*') e das proteínas de capsídeo VP1 e VP2 do Parvovírus humano B19 (Yoto *et al.*, 1995).

Outro sistema que tem sido usado atualmente é o baculovírus como apresentador de antígenos (*display*) que consiste na fusão do gene da proteína de interesse com partes da proteína de envelope GP64 de baculovírus (Rychlowska *et al.*, 2011). A proteína GP64 é uma glicoproteína altamente abundante no envelope da partícula BV de AcMNPV. Esse método surgiu a partir da característica de “brotamento” da partícula viral durante o ciclo de infecção. O fenótipo BV faz a infecção célula-célula, sendo responsável assim pela propagação da infecção no inseto. Quando o BV se liga a receptores na superfície celular acontece a endocitose da partícula viral. A vesícula endocítica é altamente acidificada e induz a mudança conformacional na GP64, fazendo com que o envelope se funda com a membrana endossomal, liberando o nucleocapsídeo no interior celular. Este nucleocapsídeo entra no núcleo onde o DNA é replicado e os novos nucleocapsídeos da progênie viral são montados, enquanto no retículo endoplasmático novas proteínas são sintetizadas, processadas no aparelho de Golgi e endereçadas a superfície celular. Quando os novos nucleocapsídeos produzidos no núcleo saem em direção ao exterior celular, eles “brotam” do interior celular para o exterior, levando junto com o novo envelope, proteínas GP64 dispostas na superfície da partícula (Rohrmann, 2013). Assim, uma vez que a proteína de interesse esteja fusionada com GP64, também será apresentada na superfície celular.

Relatos na literatura demonstram que a utilização deste tipo de expressão com fins biotecnológicos tem alcançado bons resultados. Como o estudo de Yang *et al.* (2007), onde a proteína HA de Influenza aviária foi expressa eficientemente na superfície de BV de AcMNPV. Além disso, a proteína E (envelope) do vírus da encefalite japonesa também foi expressa na superfície de BV de baculovírus utilizando esse tipo de vetor. Estes BV recombinantes produzidos foram capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, contra o vírus da encefalite japonesa em camundongos (Xu *et al.*, 2011).

Outro fator importante relacionado ao sistema BEVS é que este possui alternativas na ampliação as escalas de produção industrial. O cultivo de células pode ser ampliado a cultivo em grandes volumes por diversos sistemas como fermentadores adaptados, biorreatores computadorizados com diversos *designs* e sistemas que aumentam o volume de cultivo ou densidade de células aderentes. Todos estes suportam a inclusão do vírus vetor de expressão. E os benefícios desta produção é a homogeneidade do produto em termos de modificações pós-traducionais, uma maior simplicidade nos processos seguintes de purificação da proteína recombinante, especialmente se forem utilizados meios de cultura livre de proteínas (soro fetal bovino, hidrolisados). Já os pontos negativos envolvem os custos associados a manutenção das

células, como gasto ampliado com material de cultivo (meio de cultura e suplementos como soro fetal bovino).

Outro mecanismo é o uso de larvas de insetos suscetíveis ao vetor de expressão, alternativa considerada de baixo custo. No caso dos baculovírus AcMNPV e BmNPV, as larvas das espécies *Trichoplusia ni* e *Bombyx mori*, respectivamente, já foram relatadas como biorreatores vivos (Liu; DeCarolis; Beek, 2007). Neste caso, as condições, matérias e procedimentos são bem distintos do cultivo de células de inseto. Os custos com equipamentos e materiais para manter a produção de larvas não são altos, as dietas sólidas são basicamente compostas por grãos e leite em pó. As larvas podem ser mantidas em potes de plástico descartável que não precisam ser estéreis, assim como não é necessária a esterilização do ambiente de trabalho (Ribeiro *et al.*, 2015). O ponto mais importante é que a produtividade do BEVS em larvas é alta, trabalhos relatam quantidade de proteína produzida pode chegar à mais de 1 mg de proteína por larva (Nagaya *et al.*, 2004; Sumathy; Palhan; Gopinathan, 1996; Cha *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2011).

4. Transdução de baculovírus em células de mamíferos

Os Baculovírus ainda são capazes de transduzir, ou seja, serem internalizados por células de vertebrados em mais de quarenta tipos de células de mamíferos, derivadas de suínos, roedores, mamíferos em geral e até de seres humanos. Destas, muitas linhagens de células normalmente utilizadas como de mamíferos, fibroblastos humanos, células neurais, células de ilhotas pancreáticas, bem como culturas primárias, foram eficientemente transduzidas (Kost; Condreay, 2002).

Kost; Condreay e Jarvis (2005) demonstraram que baculovírus podem ser usados como vetor de entrega gênica em células de mamíferos, pois ao entrar nas células de mamíferos, os baculovírus não se replicam e não provocam efeitos citotóxicos consideráveis nas células e tampouco representam qualquer influência negativa ao crescimento celular, mesmo em alta multiplicidade de infecção.

O fato de não se replicarem em células de mamíferos está relacionado com a ausência ou a limitada transcrição dos seus principais genes regulatórios (Liu; DeCarolis; Beek, 2007). Diante disso, os baculovírus recombinantes são considerados uma ferramenta biotecnológica poderosa para entrega de genes de interesse em células de mamíferos, e possuem várias

vantagens, especialmente quando a transdução viral é comparada com a forma mais comumente utilizada de entrega gênica, transfecção por lipossomos (Hofmann *et al.*, 1995).

E ainda há diferenças significativas entre vetores baculovirais dos vetores convencionais que além de não se replicar e nem apresentar toxicidade celular, ainda apresentam capacidade de abrigar grandes inserções de DNA exógeno, altos níveis de expressão, modificações pós-traducionais precisas, manipulação simples e altas titulações virais (Ribeiro *et al.*, 2015).

5. Baculovirus e capacidades imunoestimulatórias

Ao alcançar um hospedeiro, os vírus, assim como outros patógenos, encontram barreiras que limitam ou mesmo impedem o estabelecimento da infecção. Após invasão, o principal fator limitante que impede a disseminação dos vírus no organismo é a formação da resposta imune inata do hospedeiro, com produção de interferons do tipo I (IFN). O início desta resposta depende do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por variadas famílias de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (Elliott; Weber, 2009; Hamel *et al.*, 2015).

O baculovírus mais estudado, até o presente momento, é o AcMNPV, o qual apresenta potencial para induzir a expressão e promover a liberação de diversas citocinas inflamatórias, como observado em modelos murinos e em células de mamífero. Ao ser injetado no organismo, este vírus pode induzir uma resposta imune inata, mediada por macrófagos e ativação da via clássica do sistema complemento (Hofmann *et al.*, 1995). As principais citocinas produzidas são dependentes das vias de ativação dependentes e independentes do receptor *toll-like* 9 (TLR-9) (Abe *et al.*, 2009), pela interação diretamente com os baculovírus como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Beck; Sidhu; Omiecinski, 2000) e interferons do tipo I (IFN- α/β) (Gronowski *et al.*, 1999), que auxiliam na resposta inflamatória local e defesa antiviral. Além disso, o AcMNPV também pode induzir imunidade adaptativa, caracterizada como uma resposta imune específica contra produtos de genes virais, tanto heterólogos, expressos nas células, como do próprio baculovírus (Abe *et al.*, 2005).

Dados de Bocca *et al.* (2013), estudando a infecção pela via intra-nasal de camundongos (fenótipos BV e OB) com o AcMNPV e o *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), demonstraram que tanto as poliedrinas como os BV não induziram uma resposta inflamatória nos pulmões, no entanto o tratamento de animais

infectados com *P.brasiliensis* com a poliedrina do AgMNPV induziu a formação de granulomas mais compactos, sem reduzir a carga fúngica. Os BVAc e BVAg aumentaram a migração celular para o pulmão de TDC8⁺ em camundongos não infectados, bem como a expressão de moléculas como CCR1 e CXCR3, presente em macrófagos e linfócitos. Analisando as propriedades destes dois vírus *in vitro*, foi observado que todas as formas foram capazes de estimular a fagocitose de leveduras por macrófagos, bem como a produção de TNF- α e produção de interferon-gama (IFN- γ) por esplenócitos *in vitro*. Além disso, proteínas do AgMNPV são capazes de aumentar a produção de interleucina-12 (IL-12) e a proliferação celular de esplenócitos *in vitro*. Os autores acreditam que as células dendríticas infectadas pelo baculovírus induzem resposta imune não específica e que os baculovírus pode ser usado como um agente de imunoterapia ou com alguma abordagem em relação às vacinas, como adjuvantes.

Considerando tais propriedades imunogênicas dos baculovirus e sua capacidade limitada de infectar células de mamíferos, acredita-se que este sistema é um candidato seguro e eficaz, para produção de vacinas recombinantes, visto que já há no mercado várias vacinas aprovadas utilizando baculovirus e sendo comercializadas.

Capítulo I

Expressão de um peptídeo imunogênico da glicoproteína do vírus da raiva na superfície da partícula viral de um baculovirus

1. Vírus da Raiva

A raiva é uma encefalite aguda e progressiva que afeta mamíferos, sendo os principais reservatórios guaxinins, gambás, raposas, coiotes e morcegos (Jacob *et al.*, 2000; Lackay; Kuang; Fu, 2008). No Brasil, o vírus é transmitido frequentemente por morcegos infectados, em áreas rurais (Cleaveland *et al.*, 2006), trazendo sérios problemas devido ao número crescente de herbívoros contaminados, especialmente bovinos. Os prejuízos econômicos diretos anualmente ultrapassam a casa de 15 milhões e na América Latina ultrapassam 30 milhões de dólares com morte de 100 mil bovinos por ano (Brasil, 2015).

A raiva também se apresenta de grande importância para a saúde pública, em especial nos países em desenvolvimento, que apresentam um maior número de casos da doença (Meslin; Fishbein; Matter, 1994). Segundo dados da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), em todo o mundo, 59 mil pessoas morrem a cada ano desta doença, principalmente na Ásia e na África. Atualmente, quatro países da América Latina e do Caribe ainda apresentam casos de raiva canina, onde ao menos 1 mil cães contraíram raiva e 19 pessoas morreram na região em decorrência da doença. Em média 90% dos casos em cães e 100% em humanos foram registrados em Bolívia, Guatemala, Haiti e República Dominicana onde a raiva ainda é endêmica (Opas, 2018).

Essa zoonose é considerada uma doença negligenciada, que se enquadra no espectro de doenças que devem ser eliminadas até 2022. No caso da raiva transmitida por cães, o seu controle é possível através de uma série de estratégias e sua prevenção são prioridades para a Organização Mundial de Saúde (OMS), fazendo parte dos programas de vigilância de diversos países, inclusive do Brasil. Tais programas visam à eliminação da raiva em cães e gatos por meio de vacinação visto que esta é uma doença de notificação compulsória, onde entre os anos de 2010 e 2018 foram registrados 36 casos de raiva humana. No entanto, em 2014, não houve registros desta doença, que pode estar relacionado com o ciclo de vida dos morcegos que são os principais transmissores (Brasil, 2018). E estes programas ainda contam com imunização de

acordo com esquema de profilaxia pré-exposição de pessoas em risco ocupacional, profilaxia pós-exposição e vigilância epidemiológica (Who, 2015).

O agente etiológico da raiva é o *Rabies virus*, que pertence à família *Rhabdoviridae* e é um dos sete genótipos virais do gênero *Lyssavirus*. Estes genótipos virais se diferem em seu caráter antigênico devido a características da glicoproteína G (GPV), o determinante primário de sua neuropatogenicidade e o maior indutor de proteção imune (Morimoto *et al.*, 2001). Além disso, produz anticorpos neutralizantes de proteção que podem servir como antígenos no desenvolvimento de vacinas e diagnóstico. Um exemplo é o estudo de Marissen *et al.*, (2005), que realizou experimentos com a tentativa de mapear a região mínima da glicoproteína G (aminoácidos 218 a 240 da GPV) que é reconhecida por anticorpos monoclonais, uma vez que algumas estirpes do vírus da raiva conseguem escapar da neutralização de anticorpos (Bakker; Marissen; Goudsmit, 2006). O gene da glicoproteína G destas variantes anticorpo-resistentes foi sequenciado e resíduos críticos de aminoácidos envolvidos na ligação de cada um desses anticorpos foram identificados e testados por meio de análises de ligação, por meio do método “Pepscan” que se baseia em sintetizar vários peptídeos randômicos de alguma glicoproteína G de interesse e que podem ser usados diretamente em ELISA, dado que estes peptídeos podem ser reconhecidos por anticorpos neutralizantes (Geysen *et al.*, 1984; Miles *et al.*, 1989; Slootstra *et al.*, 1996).

O vírus rabies tem formato de um projétil e possui RNA fita simples sentido negativo, não segmentado e envelopado (Smith; Yager; Baer, 1996; Wunner, 2007). Por ser envelopado, o torna mais sensível a detergentes e solventes lipídicos como éter e clorofórmio, o que torna sua infectividade fora do hospedeiro muito baixa (Dietzgen *et al.*, 2012). O seu genoma codifica cinco proteínas: uma nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (P), uma RNA polimerase (L), uma proteína de matriz (M), e uma glicoproteína transmembrana (GPV) (Figura 5.) (Pinto; Bosch; Bishop, 1994).

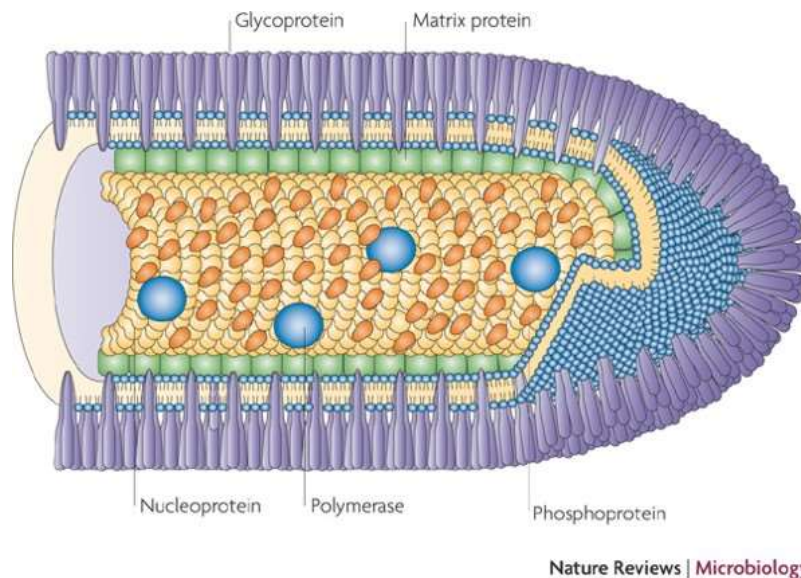


Figura 5. Esquema representativo do vírus rabies, destacando as suas 5 proteínas: glicoproteína, proteína de matriz, nucleoproteína, RNA polimerase e fosfoproteína. Adaptado de Whitt *et al.*, 1991.

A GPV, faz parte do envelope que reveste o nucleocapsídeo viral e facilita o brotamento de novos vírions, bem como sua propagação célula a célula (Finke; Conzelmann, 2003). Além disso, a proteína G desempenha papel importante durante a infecção viral, uma vez que o vírion depende dela para entrada na célula hospedeira mediante ligação a receptores e fusão de membrana (Luo *et al.*, 2007). Esta proteína possui uma estrutura trimérica (Gaudin, 1992) com 438 aminoácidos, que formam um ectodomínio com três potenciais sítios para glicosilação, do tipo N-ligada, um domínio transmembrana de 22 aminoácidos e um domínio citoplasmático com 44 aminoácidos (Whitt *et al.*, 1991). E ainda ela é capaz de estimular, em conjunto com as proteínas N e P, células T auxiliares e citotóxicas, gerando uma resposta imune celular, além de participar do processo de brotamento de novos virions (Kawano *et al.*, 1990; Tordo *et al.*, 1988). A expressão da GPV parece estar associada a indução de apoptose e a inibição da atividade da proteína N no transporte axoplásmico, ou seja, quanto maior a expressão da GPV, mais apoptose e maior inibição do transporte viral nos neurônios, resultando em menor patogenicidade (Morimoto *et al.*, 1999).

A raiva apresenta dois principais ciclos de transmissão: urbano e silvestre. Contudo, em relação à fonte de infecção, subdivide-se a transmissão desta zoonose em quatro ciclos epidemiológicos: o ciclo aéreo, mantido pelos morcegos; o ciclo rural; envolvendo animais de produção; ciclo urbano, mantido pelos cães e gatos; e o ciclo silvestre terrestre, mantido por outros mamíferos silvestres como raposa, cachorro e gato do mato, guaxinins, jaritatacas, mão

pelada, gambás, saruês e saguis. O ciclo urbano continua sendo o mais importante para a manutenção da raiva humana no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (Brasil, 2018) (Figura 6.).

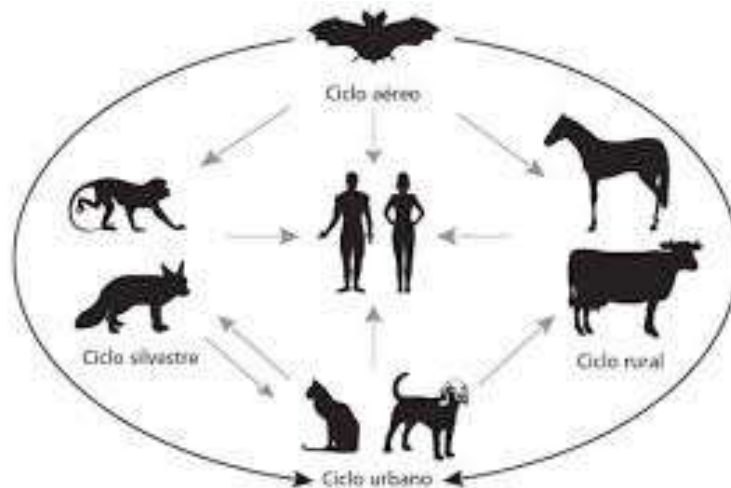


Figura 6. Ciclos epidemiológicos de raiva no Brasil. Adaptado de (Da Silva, 2016).

A entrada do vírus no organismo ocorre mais comumente da mordedura de animal infectado e em casos mais raros por ferimentos, contato direto com superfícies mucosas (olhos, nariz, boca), transmissão por aerossol e transplantes de órgãos e córnea (CDC, 2008). Assim, as partículas virais da raiva podem percorrer dois caminhos: se replicam em células musculares próximo ao local de inoculação, antes de invadir o sistema nervoso central, representando um passo primordial para a invasão do sistema nervoso (Tsiang, 1993). Contudo, ocasionalmente pode ocorrer a entrada direta do vírus no sistema nervoso central, sem replicação prévia em células musculares atingindo o cérebro em torno de 20 a 50 dias causando uma doença aguda e fatal associada a intensa replicação viral no sistema nervoso central (Seif *et al.*, 1985), atingindo principalmente o hipocampo, tronco cerebral e as células de Purkinje, no cerebelo. Uma vez infectado células neuronais, o vírus é conduzido aos nervos periféricos e através de transporte axoplásmico retrógrado, ao sistema nervoso central, posteriormente, disseminando-se por todo o organismo.

Antígenos virais já foram detectados em células da epiderme, folículos pilosos, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmões, músculo cardíaco, mucosa gástrica e intestinal, pâncreas, parênquima renal, glândulas adrenais, tecidos neuroepiteliais dos ureteres,

bexiga e uretra (Charlton, 1994). O principal meio de disseminação do vírus rábico na natureza é através da secreção das glândulas salivares (Iwasaki, 1991).

Uma vez iniciados os sintomas clínicos (mal-estar geral, aumento da temperatura, anorexia, cefaleia, náuseas, dor de garganta, entorpecimento, irritabilidade, inquietude e sensação de angústia), que costumam variar de acordo com a área cerebral afetada, não há nenhuma terapia efetiva que combata a proliferação da doença, levando os infectados a óbito (Takamaya *et al.*, 2008). Estas manifestações clínicas também são classificadas pela forma paralítica e furiosa que vai depender das variantes virais do vírus, da origem geográfica, espécie hospedeiro reservatório e ainda da espécie infectada (Dietzgen *et al.*, 2012). A manifestação da raiva furiosa é mais frequente em variantes do vírus encontrada em morcegos carnívoros domésticos e selvagens na região nordeste do Brasil (Carnieli *et al.*, 2006). Enquanto a raiva com sinais clínicos de paralisia é mais comum em isolados relacionados com morcegos hematófagos, que é prevalente em todas as regiões do Brasil (Brasil, 2015; Favoretto *et al.*, 2002).

Neste sentido, para prevenir a disseminação da raiva, a vacinação é a forma mais eficaz e tem proporcionado grande avanço no controle desta doença e ela é disponibilizada gratuitamente pelos órgãos de saúde em países desenvolvidos (Who, 2016). Normalmente, as vacinas contra a raiva são baseadas na capacidade da GPV em induzir a produção de anticorpos neutralizantes e ativação de células do sistema imune, tendo como resultado a proteção contra a doença, mesmo em um desafio intracerebral (Jallet *et al.*, 1993; Lodmell; Esposito; Ewalt, 2004). Para o desenvolvimento e produção de vacinas contra o vírus da raiva, a Organização Mundial da Saúde recomenda que seja realizado testes para a verificação dos títulos de anticorpos neutralizantes, determinados por soroneutralização em camundongos ou em células, o qual considera níveis de anticorpos neutralizantes maiores ou igual a 0,5 UI/ml como protetivos (Who, 2002).

A primeira vacina antirrábica foi produzida em 1895 por Louis Pasteur e foi obtida a partir da medula óssea de coelhos infectados, posteriormente tratados com potássio, a fim de atenuar a virulência (Kotait; Carrieri; Takaoka, 2009). Fuenzalida e Palacios, (1955) desenvolveram uma vacina conhecida como primeira geração produzida em cérebro de camundongos recém-nascidos, quando o cérebro ainda não apresenta níveis consideráveis de mielina, reduzindo os efeitos colaterais. Posteriormente, Koprowski e Cox, (1948) testaram vacinas de segunda geração, produzidas em ovos embrionados. Entretanto, estas vacinas apresentavam baixa antigenicidade e reações alérgicas decorrentes da presença de proteínas do

ovo, além de apresentarem partículas de vírus não inativados (Rupprecht; Hanlon; Hemachudha, 2002).

Com a possibilidade de produção de vacinas de vírus atenuado ou inativados e expressão de antígenos virais pelos sistemas de expressão de proteínas heterólogas, novas vacinas contra raiva tem sido desenvolvidas (Cenna *et al.*, 2008; Faber *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2005; Loza-Rubio *et al.*, 2007; Lyons *et al.*, 2008).

Há ainda, as vacinas recombinantes para animais, disponíveis no mercado mundial que se utilizam da expressão da GPV; e as principais produzidas no Brasil para herbívoros são derivadas do vírus da raiva em cultura de células de mamíferos, as quais são inativadas, purificadas e concentradas, se mostrando bastante eficazes, porém, sua produção é de alto custo (Plotkin, 2000). Assim, a perspectiva de expressão de peptídeos da GPV em células de fácil manipulação, como as de insetos, se apresenta como potencial para uso na produção de insumos visando a estimulação do sistema imune e soroneutralização do vírus rabies, contribuindo desta forma com as pesquisas na área da saúde, e diminuindo assim o número de indivíduos afetados e também os prejuízos econômicos causados ao país pela doença da raiva.

Atualmente, as vacinas baseadas em peptídeos têm chamado a atenção devido ao baixo custo, processo de produção simples e segurança (Houimel; Dellagi, 2009). E se forem aliadas as propriedades imunogênicas dos baculovirus e sua capacidade limitada de infectar células de mamíferos, a sua utilização como vetor para expressar proteínas do vírus da raiva poderia contribuir para a ativação dos linfócitos B e T, não sendo necessário a utilização de adjuvantes a vacina. Por estes motivos, o peptídeo da GPV é um importante candidato a ser testado como uma vacina de subunidade.

Desta forma, nesse trabalho fusionamos a porção do gene GPV contendo o peptídeo imunogênico (Marissen *et al.*, 2005) ao gene da proteína de superfície (GP64) ao baculovírus AgMNPV, gerando partículas baculovirais contendo o peptídeo da GPV na superfície do baculovirus.

2. Objetivo

2.1. Geral

Expressão de um peptídeo derivado da GPV em células de inseto usando BEVS

2.2. Metas

- Clonar a sequência nucleotídica que codifica uma região sabidamente imunogênica da GPV fusionado ao gene *gp64* do AgMNPV no vetor de transferência;
- Construir um baculovírus recombinante contendo o gene químera;
- Analisar a expressão da proteína recombinante na superfície da partícula viral do AgMNPV;

3. Material e Métodos

3.1. Células e Vírus

Foram utilizados neste trabalho, baculovírus recombinante derivado do *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* isolado E2 (AcMNPV-E2) na forma de um grande plasmídeo denominado bacmídeo (bMON14272) usando o kit comercial de construção de baculovírus recombinantes Bac-to-Bac® “Baculovirus Expression System” da empresa Invitrogen. Este sistema utiliza células *Escherichia coli* DH10Bac (Invitrogen) para propagação dos plasmídeos construídos. O baculovírus recombinante vAcPH-RGPV (Barros, 2011), foi derivado do bacmídeo bMON14272 (Bac-to-Bac). Os diferentes baculovírus utilizados nesse trabalho foram propagados em cultura de células derivadas do inseto *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4 ou Tn5B) (Granados *et al.*, 1994) e *Spodoptera frugiperda* (IPLB-Sf21AE) (Vaughn *et al.*, 1977), que foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL) com 10% de soro bovino fetal a 27°C.

3.2. Bactérias e plasmídeos

Para construção e propagação dos diferentes plasmídeos usados neste trabalho foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* das linhagens DH5 α , DH10B ou One Shot® TOP10 (Invitrogen). Para os bacmídeos, foram usadas as células *E. coli* da linhagem DH10Bac (Invitrogen).

O plasmídeo pFASTBAC ACCI GP64 Ag foi utilizado para clonagem do gene de interesse nesse trabalho (Chaves, 2016).

Este plasmídeo possui sequências de DNA que codificam partes do gene da proteína de envelope GP64 do baculovírus AgMNPV que foram quimicamente sintetizadas: o promotor do gene *gp64* (pGP64), o seu peptídeo sinal (os), domínios da cauda citoplasmática (DCT) e transmembrana (TM), uma sequência de seis histidinas (6xHis) e um sítio da enzima de restrição *Bam*HI, que foi utilizado para a inserção do gene de interesse com a finalidade de construção de genes híbridos.

3. 3. Construção do vetor de transferência contendo a sequência nucleotídica de um peptídeo neutralizante da proteína GPV

Uma região de 22 aminoácidos da GPV foi reconhecida como alvo de anticorpos monoclonais neutralizantes (aminoácidos 218 a 240 da GPV) (Marrissen *et al.*, 2005). Usando os oligonucleotídeos pepRAIVABamH1 F e pepRAIVABamH1 R um fragmento de DNA (114 pb) foi amplificado a partir do plasmídeo pGPV/PV como um fragmento de 1.615 pb (Barros, 2011) codificando essa região (pepGPV) foi amplificado por PCR como descrito abaixo. O fragmento pepGPV amplificado foi clonado no plasmídeo pFASTBAC ACCI Ag (Chaves, 2016), fusionando as regiões do gene *gp64* de AgMNPV a esse fragmento, gerando assim o gene híbrido pepGPVGP64xHisAg (Figura 7.).

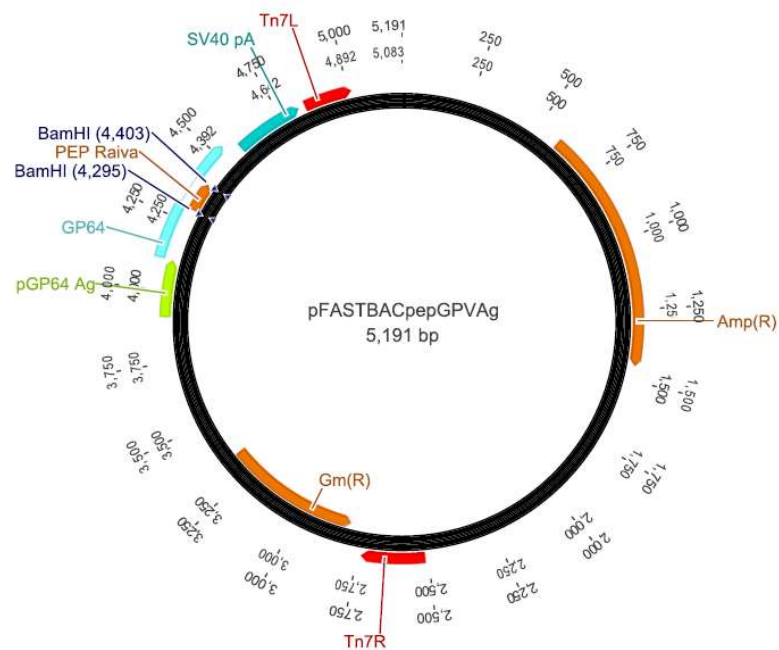


Figura 7. Esquema representativo da construção do gene híbrido contendo o fragmento pepGPV inserido no plasmídeo pFASTBAC ACCI Ag. O esquema mostra o gene híbrido com o framento do peptídeo neutralizante da proteína GPV do vírus da Raiva (pepGPV) fusionado ao gene da proteína GP64 do baculovírus AgMNPV. Podemos observar sítio de restrição da enzima *BamHI* que foi utilizado para clonagem do cassete de expressão que consiste em promotor GP64 (pGP64), gene gp64 (composto de PS, pequena região N-terminal, TM e CTD) + pepGPV, gene de resistência a Ampicilina (Amp), gene de resistência a Gentamicina (Gm), regiões de transposição Tn7R e Tn7L, sinal de poliadenilação SV40 pA, origem de replicação pUC e origem de replicação f1 (esse plasmídeo possui duas origens de replicação para gerar um maior número de cópias). Mapa construído usando o programa Geneious (Biomatters Limited).

A reação de PCR foi realizada em termociclador (Swift Max (ESCO®) e para amplificação do fragmento pepGPV foi realizada a seguinte reação: 5 µL do tampão de reação 10X da enzima Taq DNA polimerase (Long amp® *Taq* DNA Polymerase, NEB), 1 µL da mistura dos quatro dNTPs (solução estoque 10mM), 1 µL do oligonucleotídeo pepRaiva BamHI F (solução estoque 10 µM), 1 µL do oligonucleotídeo pepRaiva BamHI R (solução estoque 10 µM) conforme (Tabela 1), 0,5 µL do DNA (~50 ng/µl) (Barros, 2011), 2 U (unidades) da enzima Taq DNA polimerase (Long amp® *Taq* DNA Polymerase, NEB) e água “milli-Q” para um volume final de 50 µl. O seguinte programa foi utilizado: 94°C/1 min, 30 ciclos de 94°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/30 seg e 72°C/2 min para o término da extensão. O resultado da PCR cujo tamanho esperado é de 114 pb - pFastBacGP64-GPVpep (GGATCCAGAGGCCTATATAAGTCTTTAAAAGGAGCTTGCAAACCTCCAGTTATGT GGAGTTCTCGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCTCGATGCAAACATCAG GATCC), foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% de acordo com o protocolo descrito em Sambrook; Fritsch; Maniatis, (1989) e fotografadas em um fotodocumentador (Alfa Innotec).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIA 5' ___ 3'
PepRAIVA BamHI F	GAG GAT CCA GAG GCC TAT
PepRAIVA BamHI R	TCG GAT CCT GAT GTT TGC ATC GAG ACC
pGPVs Ag pPOL R	TCC TGC AGT TAA CGG CGT GTA CAC
M13 F	GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG AC
M13 R	CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA TGA TT

Os fragmentos de DNA correspondentes à amplificação do fragmento codificando o peptídeo foram purificados do gel com o kit GFX DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) segundo instruções do fabricante. Estes fragmentos foram clonados no vetor de clonagem pGEM®-T Easy Vector (Promega), seguindo as instruções do fabricante (Figura 8.), gerando o plasmídeo pGEMpepGPV. A confirmação desta clonagem foi feita por digestão deste plasmídeo com a enzima de restrição *Bam*HI (5 µl de DNA (~30 ng/µl), 1U de enzima - Promega, 0,1 µL BSA 10X, 1 µL do tampão de reação 10X, e água “milli-Q” para um volume final de 10 µL). Foi também realizado uma PCR, com os oligonucleotídeos pepRAIVABamHI

F e pGPVsAgpPOL R para confirmação da clonagem. Após confirmação, o plasmídeo foi sequenciado (Macrogen, Coréia do Sul).

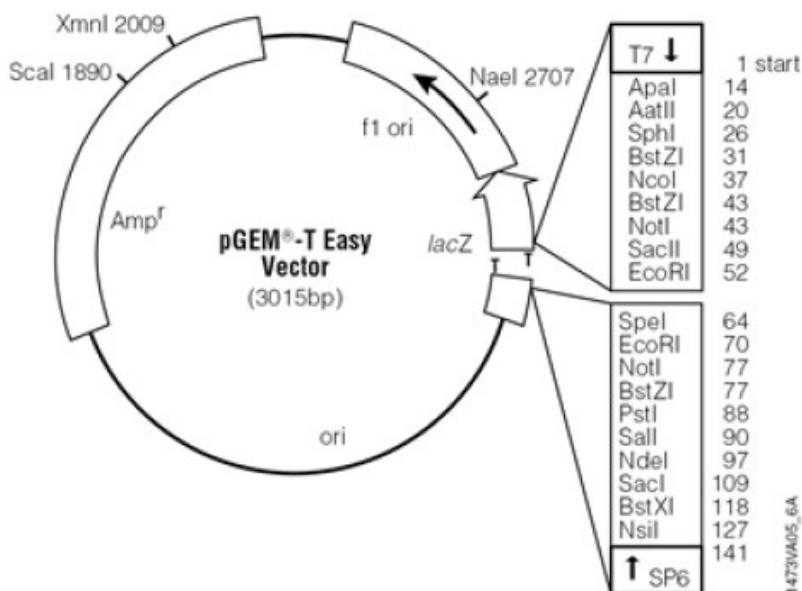


Figura 8. Esquema representativo do plasmídeo pGEM® -T Easy – Promega. Os sítios para enzima de restrição, o gene lacZ e o gene de resistência ao antibiótico ampicilina então indicados na figura.

Para clonagem do fragmento, contendo o peptídeo a partir do pGEMpepGPV, no vetor pFASTBAC ACCI Ag, foi realizada digestão de ambos com a enzima de restrição *Bam*HI, (Promega) (20 µl de DNA (~30 ng/µl), 1U da enzima, 0,4 µL BSA 10X, 4 µL do tampão de reação 10X, e água “milli-Q” para um volume final de 40 µL). Esta reação de digestão foi mantida em estufa a 37° C por 16 h (“overnight”). O vetor pFASTBAC ACCI Ag ainda foi desfosforilado utilizando 20 µl (~30 ng/µl) de DNA plasmidial digerido e 15U da enzima TSAP (Fosfatase alcalina termo-sensível - Promega), seguindo especificações do fabricante. A reação foi incubada 15 min a 37°C e 15 min a 70°C.

O plasmídeo pFASTBAC ACCI Ag digerido e desfosforilado foi utilizado em reação de ligação com o fragmento digerido pGEMpepGPV que foi purificado do gel, eluído e purificado com o kit GFX DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) segundo instruções do fabricante. Para a reação de ligação foram utilizados a enzima T4 DNA ligase (Promega), 5.5 µl de DNA inserto (~10,2 ng/µl), 1U da enzima, 3 µL de DNA do vetor pFASTBAC ACCI Ag (~22 ng/µl) e 1 µL do tampão de reação 10X para um volume final de 10 µL). Após a reação,

foi realizada uma transformação de células de *E. coli* DH10B eletro-competentes por eletroporação (Sambrook; Russel, 2001). Os clones resultantes foram selecionados pela resistência aos antibióticos ampicilina e gentamicina, conforme descrito em Sambrook; Russel, (2001).

Em seguida, foi realizada uma purificação de DNA plasmidial das colônias recombinantes por lise alcalina (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989). Um ml do meio de cultura contendo a colônia recombinante foi centrifugado 5 min a 5.000 rpm (Centrífuga 5418 – Eppendorf), o sobrenadante foi removido e o precipitado ressuscitado em 100 µl de solução I (50mM glicose, 25mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) seguido de incubação em gelo por 2 min. Após, foi acrescentado 200 µl de solução II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) e incubado 5 min no gelo, acrescentado mais 150 µl de solução III (acetato de potássio 5M, ácido acético glacial – 99.7%) e incubado 20 min no gelo para na sequência centrifugar a mostra por 10 min a 14.000 rpm. (Centrífuga 5418 – Eppendorf). O sobrenadante obtido foi transferido para outro tubo, e acrescentado 200 µl de clorofórmio, seguido de centrifugação como descrito acima. A fase superior formada na parte de cima do tubo foi coletada e transferida para outro tubo, onde foram adicionados 350 µl (0,6%) de isopropanol, seguido de nova centrifugação por 10 min a 14.000 rpm na temperatura de 15 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 500 µl de etanol 70% que foi centrifugado novamente como descrito acima. Por fim, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado (DNA) foi ressuscitado em 50 µl de água. Este DNA plasmidial foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% de acordo com o protocolo descrito em Sambrook; Fritsch; Maniatis, (1989).

Para a confirmação da clonagem foi realizada uma reação de PCR, onde foram utilizados: 1 µL do tampão de reação 10X da enzima Taq DNA polimerase (*Taq* DNA Polymerase, PHT), 0,3 µL da mistura dos quatro dNTPs (solução estoque 10mM), 0,4 µL do oligonucleotídeo pepRAIVA *Bam*H1 F (solução estoque 10µM), 0,4 µL do oligonucleotídeo pGPVsAgpPOL R (solução estoque 10µM) conforme (Tabela 1), 1 µL do DNA – (~50 ng/ µl), 2U (unidades) da enzima Taq DNA polimerase (*Taq* DNA Polymerase, PHT) e água “milli-Q” para um volume final de 10 µl. O seguinte programa foi utilizado: 94°C/1 min, 30 ciclos de 94°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/30 seg e 72°C/2 min para o término da extensão. O resultado da PCR cujo tamanho esperado é de 250 pb, foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Uma vez confirmada à clonagem o plasmídeo foi denominado pFastBacGP64-GPVpep e o DNA sequenciado (Macrogen, Coréia do Sul).

3.4. Obtenção de baculovirus recombinantes

O vetor pFastBacGP64-GPV_{pep} construído foi utilizado para construção do baculovirus recombinante, utilizando o sistema Bac-to-Bac® “Baculovirus Expression System” (Invitrogen). Resumidamente, neste sistema o gene de interesse é clonado em um plasmídeo doador pFastBac™, e o plasmídeo recombinante é transformado em células competentes DH10Bac™ que contém um bacmídeo com um sítio de transposição mini-attTn7 e o plasmídeo auxiliar (pHelper). O sítio mini-Tn7 no plasmídeo pFastBac™ doador pode transpor para o sítio de destino mini-attTn7 no bacmídeo através de proteínas de transposição no plasmídeo auxiliar. Colônias contendo bacmídeos recombinantes são identificados pelo rompimento do gene lacZα. O DNA dos bacmídeos recombinantes é extraído e este é, então, usado para transfecção em células de insetos (Luckow *et al.*, 1993) (Figura 9.).

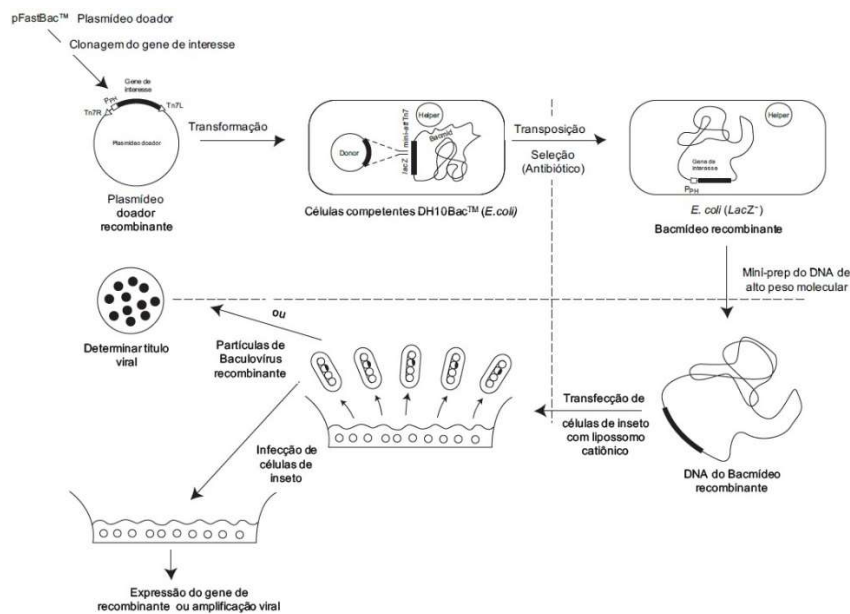


Figura 9. Esquema mostrando o sistema Bac-to-Bac da Invitrogen. O gene de interesse clonado no vetor de transferência é transformado em células *E. coli* (DH10Bac) que possui o genoma do vírus AcMNPV na forma de um grande plasmídeo (bacmídeo). O gene de interesse está flanqueado por regiões de transposição do transposon TN7 (regiões TN7L e TN7R). O bacmídeo possui o sítio alvo de inserção do transposon TN7, onde será inserido o gene de interesse sob o comando do promotor da *polh* e o gene do antibiótico gentamicina. Essa transposição ocorre através do plasmídeo (‘helper’), que codifica para a enzima transposase. A transposição é confirmada através da seleção por antibióticos e a complementação da β-galactosidase. Depois de uma lise alcalina em pequena escala (miniprep) para obtenção do DNA, e realizado a transfecção de células de inseto com a ajuda de lipossomos catiônicos, onde o DNA do baculovirus infecta as células de inseto. O sobrenadante da transfecção contendo os vírus no fenótipo BV é utilizado para amplificação viral através da infecção de células de inseto ou para determinação do título viral. Fonte: Manual Bac-to-Bac.

Os transformantes foram selecionados pelos antibióticos tetraciclina (10µg/ml), gentamicina (7µg/ml), canamicina (50µg/ml); e pelos marcadores de seleção IPTG (40µg/ml) e X-Gal (100µg/ml) após 48 h em estufa a 37°C. As colônias brancas foram coletadas e o DNA foi purificado por lise alcalina conforme descrito no item 3.3.

Para confirmação dos bacmídeos recombinantes foi realizado uma reação de PCR, onde foram utilizados: 1 µL do tampão de reação 10X da enzima Taq DNA polimerase (*Taq* DNA Polymerase, PHT), 0,3 µL da mistura dos quatro dNTPs (solução estoque 10mM), 0,4 µL do oligonucleotídeo M13 F (solução estoque 10µM), 0,4 µL do oligonucleotídeo M13 R (solução estoque 10µM) conforme (tabela 1), 1 µL do DNA – (~50 ng/ µl), 2U (unidades) da enzima Taq DNA polimerase (*Taq* DNA Polymerase, PHT) e água “milli-Q” para um volume final de 10 µl. O seguinte programa foi utilizado: 93°C/3 min, 30 ciclos de 94°C/45 seg, 55°C/45 seg, 72°C/5 min e 72°C/7 min para o término da extensão. O resultado da PCR cujo tamanho esperado é de 2.499 pb, foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% conforme Sambrook; Fritsch; Maniatis, (1989).

Uma vez a clonagem confirmada, o DNA plasmidial da célula DH10Bac™ contendo o bacmídeo recombinante (BacGP64Ag-GPVpep), foi utilizado para transfectar células de inseto BTI-Tn5B1-4. Foram adicionados 400 µL de meio de cultura TC-100 sem soro no 3 µL DNA plasmidial (bacmídeo) (~30 ng/µl) em uma placa de poliestireno e 10 µL de lipossomos (Cellfectin®, Invitrogen) em 400 µL de meio de cultura TC-100 sem soro em outra placa e depois as soluções foram misturadas. Esta mistura foi incubada por 30 min à temperatura ambiente. O meio de cultura da placa de células foi, posteriormente, substituído por 800 µL da mistura DNA/lipossomos e meio, possibilitando a cobertura da monocamada de células. Após 4h de incubação da placa, à temperatura ambiente, a (mistura DNA/lipossomos e meio) foi descartada e foram adicionados 1,5 ml de meio de cultura TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino nas células onde elas foram incubadas a 28°C por sete dias. As células de inseto que foram transfectadas com o DNA do baculovírus recombinante foram capazes de produzir vírus, pois é sabido que o DNA nu do baculovírus é infectivo (Burang; Summers, Smith, 1980). Após este período, a infecção foi analisada em microscopia de luz (Axiovert 100, Zeiss) que permitiu avaliar a presença de efeitos citopáticos característicos da infecção por baculovírus. O sobrenadante da placa de transfecção (vAcGP64Ag-GPVpep) descrito foi utilizado em novas infecções de células BTI-Tn-5B1-4 para amplificação deste vírus recombinante. Após a amplificação viral, foi realizada a titulação destes vírus. A titulação viral foi feita, por meio de diluições seriadas dos estoques virais coletados dos sobrenadantes das células infectadas em

placas de 96 poços 'Tissue culture flasks' (TPP) contendo monocamada de células BTI-Tn5B-4. Foram realizadas oito diluições virais seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) e estas células foram mantidas a 27°C por 5 dias. Após 120 h. pós-infecção (p. i.) cada poço foi analisado e marcado com o diagnóstico de poço infectado ou não. Foram somados os poços infectados em cada fileira referente a cada diluição e o título viral foi obtido por análise estatística de TCID₅₀ (dose infectante 50 %) (O'Reilly; Miller; Luckow, 1992).

3.5. Purificação de partículas virais recombinantes (BV) a partir de células infectadas pelo vírus recombinante

Células BTI-Tn5B-4 (5×10^6) foram infectadas (MOI de 10) e após 5 d. p. i., o sobrenadante das células infectadas foram coletados e submetidos a centrifugação em colchão de sacarose (25% p/v) (Phosphate Buffered Saline [PBS], 137,0 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,0 mM Na₂HPO₄, 2,0 mM KH₂PO₄, pH 7,4) para concentração e purificação dos BVs presentes no sobrenadante seguindo o protocolo descrito em O'Reilly; Miller; Luckow, (1992).

3.6. Análise da expressão do peptídeo do vírus da raiva por SDS-PAGE e *Western-blot*

As proteínas do extrato celular BTITn5B1-4 e do sobrenadante das células infectadas com o vírus recombinante vAcGP64-GPVpep contendo as partículas virais (BV), obtido após a purificação conforme item 3.5, foram analisados por eletroforese em dois géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% (Laemmli, 1970), utilizando o aparato Mini Protean II (Bio-Rad), conforme protocolo fornecido pelo fabricante e por *Western blot* (Sambrook; Russel, 2001). Após a eletroforese, um dos géis foi corado em solução de 40% de metanol, 10% de ácido acético e 0,1% de corante Azul brilhante de Coomassie R-250 por 16 h. O outro gel foi utilizado para transferência das proteínas em uma membrana de nitrocelulose (Gibco BRL- Life Technologies) (*Western blot*) conforme descrito no manual do aparato de transferência Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) e utilização do tampão de transferência *Bjerrum and Schafer-Nielsen* (48mM de Tris, 39mM de glicina, 20% de metanol, pH 9,2) por 10 min.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de PBS 1X (100 mM Na₂HPO₄, 17 mM KH₂PO₄, 1,4 mM NaCl e 27 mM KCL) e 3% de leite em pó desnatado por 16 h. Depois, a membrana foi lavada três vezes com PBS Tween (0,05%) por 5 min, em seguida foi adicionado uma solução de PBS/albumina bovina (BSA) 0,5% com o anticorpo primário policlonal anti-His (GE Healthcare) de camundongo, por 1 h sob leve agitação. A membrana foi lavada novamente três vezes em PBS Tween (0,05%) por 5 min e incubada em

PBS/BSA 0,5% com o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo, conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) por mais 1 h sob leve agitação. A membrana foi então, lavada mais três vezes com PBS Tween (0,05%) por 15 min e uma solução reveladora, NBT/BCIP (Invitrogen) foi adicionada servindo de substrato para a ação da fosfatase alcalina. Este foi mantido protegido da luz até a conversão do substrato, marcando assim, a proteína de interesse devido à presença da enzima conjugada ao anticorpo secundário que se ligou ao anticorpo primário específico. A reação foi interrompida com lavagens de água destilada para evitar marcação inespecífica.

3.7. Análise por Microscopia confocal de Varredura à Laser

Células de inseto BTI-Tn5B1-4 foram cultivadas sobre lamínulas redondas de vidro em placa de 96 poços e infectadas com o vírus recombinante vAcGP64Ag-GPV_{pep} (MOI 5). Quarenta e oito h. p. i., o sobrenadante foi retirado e as células foram fixadas com Metanol/Acetona 1:1 (fixação que permite a permeabilização das células) por 5 min a -20° C. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes em PBS 1X e incubadas com 2% BSA durante 30 min a 37° C. As células foram, então, incubadas com o anticorpo primário (Anti-His – GE, diluição 1:300) durante 1 h a 37° C. Após incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas 1 h a 37° C com o anticorpo secundário (Anti-mouse IgG - H&L (Alexa Fluor® 488, diluição 1:50). Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas com o marcador DAPI (Thermo Fisher 4',6-diamidino-phenylindole), 300 nM por 5 minutos. Composto altamente permeável a membrana plasmática, que se liga em regiões ricas em adenina-timina (A-T) do DNA dupla fita, e que pode ser utilizado tanto em células vivas (curtos períodos) quanto em células pré-fixadas. Após esta incubação, as amostras foram novamente lavadas três vezes em PBS e as lamínulas montadas sobre lâmina de vidro com *Prolong Gold Antifade*. O controle negativo (vírus selvagem de AgMNPV) foi tratado da mesma forma. Todas as amostras foram devidamente identificadas nas lâminas de vidro, o ensaio foi feito em triplicata e analisadas no microscópio confocal de Varredura à Laser (Leica TCS SP5), no intuito de verificarmos a expressão da proteína recombinante na superfície celular, que será representado pela cor verde.

4. RESULTADOS

4.1. Amplificação do fragmento pepGPV por PCR

O fragmento de DNA codificando o peptídeo pepGPV da GPV foi amplificado por PCR com uso de iniciadores específicos com sítios de reconhecimento para enzima de restrição *Bam*HI nas extremidades, conforme item 3.3, gerando a seguinte sequência (GGATCCAGAGGCCTATATAAGTCTTTAAAAGGAGCTTGCAAACCTCCAGTTATGTGGAGTTCTCGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCTCGATGCAAACATCAGGATCC) e mostrado a amplificação na (Figura 10.).

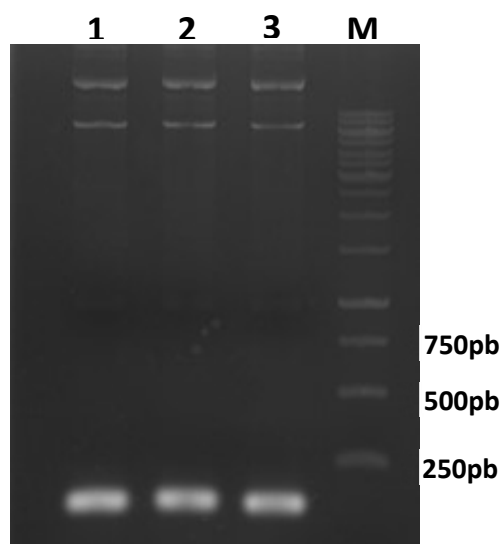


Figura 10. Amplificação do fragmento de DNA codificando para o peptídeo pepGPV da GPV. Gel de agarose 0,8% mostrando fragmentos de DNA amplificados por PCR, com oligonucleotídeos específicos. Os poços 1, 2 e 3 mostram fragmentos do peptídeo pepGPV no tamanho esperado de 114 pb. M) 1kb DNA ladder Promega.

4.2. Construção do plasmídeo pGEMpepGPV

Após amplificação do fragmento pepGPV por PCR, ele foi clonado no plasmídeo no vetor pGemT-easy. A confirmação da clonagem deste gene de interesse foi feita por digestão com a enzima de restrição *Bam*HI, e visualizado em gel de agarose 1% conforme (Figura 11A). Paralelamente, como o fragmento liberado é muito pequeno foi realizada uma PCR com os oligonucleotídeos pepRAIV*Bam*HI F e pGPVsAgpPOL R conforme item 3.3 e mostrado na (Figura 11B).

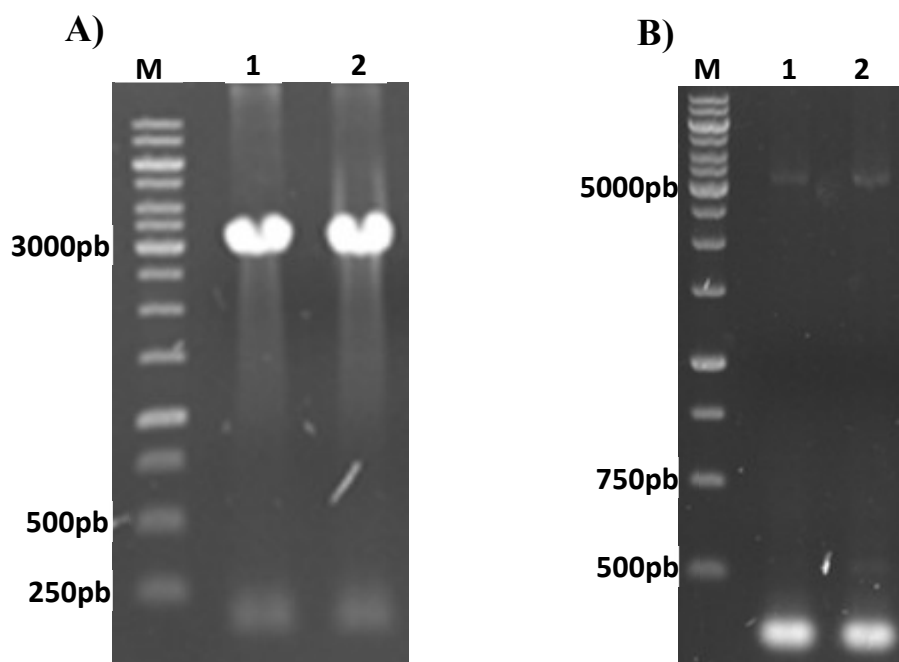


Figura 11. Análise da confirmação da clonagem do fragmento pepGPV. Gel de Agarose 0,8% mostrando fragmentos da digestão de dois clones pGEMpepGPV com *Bam*HI (A, poços 1 e 2), fragmento liberado de 114 pb, e a amplificação de dois clones por PCR usando oligonucleotídeos específicos para o fragmento pepGPV (B, poços 1 e 2) amplificando fragmentos de 250 pb como esperado. **M)** 1kb DNA ladder promega.

4.3. Obtenção do plasmídeo pFastBacGP64-GPVpep

Após obtenção do plasmídeo recombinante pGEMpepGPV, o fragmento pepGPV foi removido e clonado no vetor pFASTBAC ACCI GP64 Ag conforme metodologia descrita no item 3.4. Para confirmar a clonagem foi realizado uma PCR do DNA dos possíveis clones com oligonucleotídeos iniciadores pepRAIVABamH1 F e pGPVsAgpPOL R, conforme representação esquemática (Figura 12), a qual amplificou um fragmento de 250 pb confirmando assim a correta inserção do plasmídeo no vetor, gerando o plasmídeo recombinante pFastBacpepGPVAg. Esta PCR foi analisada em gel de agarose 0,8% (Figura 13).

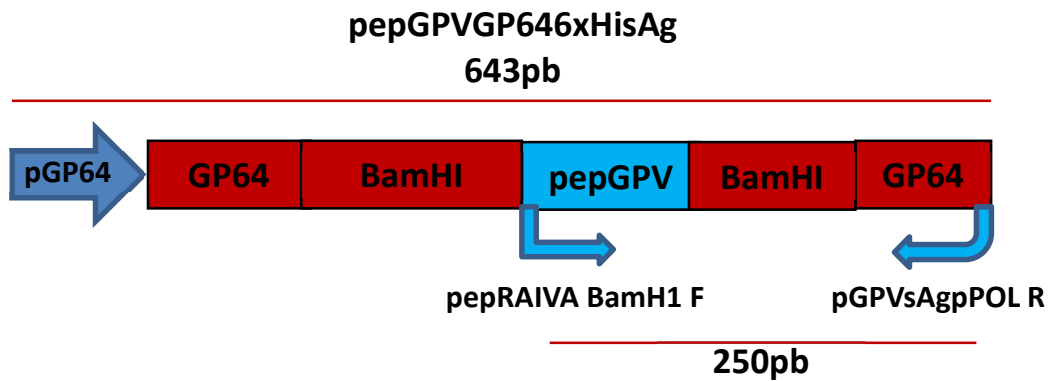


Figura 12. Esquema representativo da confirmação do plasmídeo pFASTpepGPVAg. Na figura temos o promotor pGP64, sítio de restrição de *Bam*HI, o qual foi usado para clonagem do fragmento pepGPV no vetor de transferência, sequências codificando regiões da proteína de envelope de baculovirus (GP64). E os oligonucleotídeos usados para confirmação da clonagem pepRAIVABamHI F e pGPVsAgpPOL R.

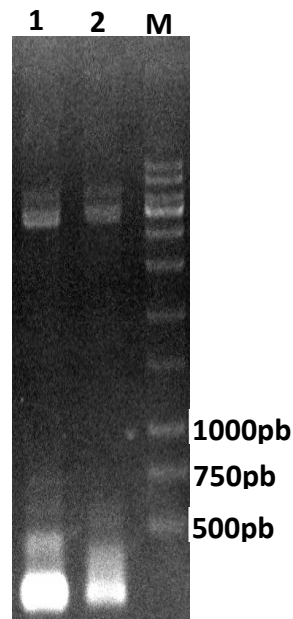


Figura 13. Confirmação da construção do vetor de transferência pFASTpepGPVAg. Gel de agarose 0,8% mostrando a amplificação por PCR de fragmentos de 250 pb a partir de clones derivados da ligação do fragmento pepGPV no plasmídeo pFASTBAC ACCI GP64 Ag. M) Marcador 1 kb ladder Ludvig. 1 e 2) Fragmentos de DNA gerados na PCR de 250 pb confirmam a clonagem.

4.4. Construção do baculovírus recombinante contendo o fragmento pepGPV e confirmação da expressão da proteína

O plasmídeo recombinante pFastBacGP64-GPVpep foi utilizado para construir o bacmídeo pelo sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen). A confirmação destes vírus foi feita por PCR com oligonucleotídeos M13F e M13R e o resultado foi visualizado através do gel de agarose 0,8% conforme (Figura 14.).

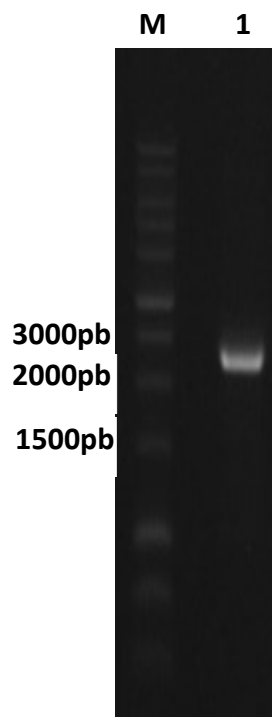


Figura 14. Confirmação da construção do bacmídeo recombinante BacGP64Ag-GPVpep. Gel de agarose 0,8% mostrando a amplificação por PCR do fragmento esperado para a correta inserção do pepGPV no bacmídeo **M)** Marcador 1Kb ladder Ludvig. **1)** Fragmento de DNA gerado na PCR de 2.499 pb confirmam a construção do bacmídeo recombinante.

O DNA do bacmídeo recombinante foi utilizado para transfecção em células BTI-Tn5B1-4. Nos primeiros 5 d. p. i foi possível observar alterações morfológicas nas células como arredondamento celular e hipertrofia nuclear, caracterizando uma infecção viral. Após 7 d. p.i. estas células foram coletadas e foi confirmado a expressão do pepGPV (22 kDa) por *Western blot* apenas no extrato celular, conforme mostrado na figura 15. O tamanho da proteína de 22 kDa foi estabelecido pelo programa Geneious 6.1.7.

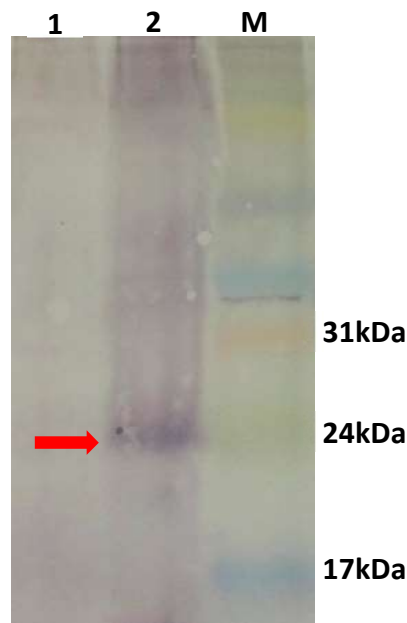


Figura 15. Confirmação da expressão de pepGPV fusionado à GP64 em células de inseto em membrana de nitrocelulose com anticorpo anti-his por *Western blot*. **M)** High-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare). **1)** Sobrenadante contendo partículas de BV de baculovírus semi-purificadas por ultracentrifugação em colchão de sacarose 25%. **2)** Extrato de células Tn5B provenientes da transfecção com vírus recombinante vAcpepGPV.

4.5. Análise por microscopia confocal de varredura à laser

A expressão da proteína pepGPV fusionada a GP64 de AgMNPV na superfície de células Tn5B infectadas foi observada através de microscopia confocal, confirmando assim a expressão da proteína (Figura 16.).

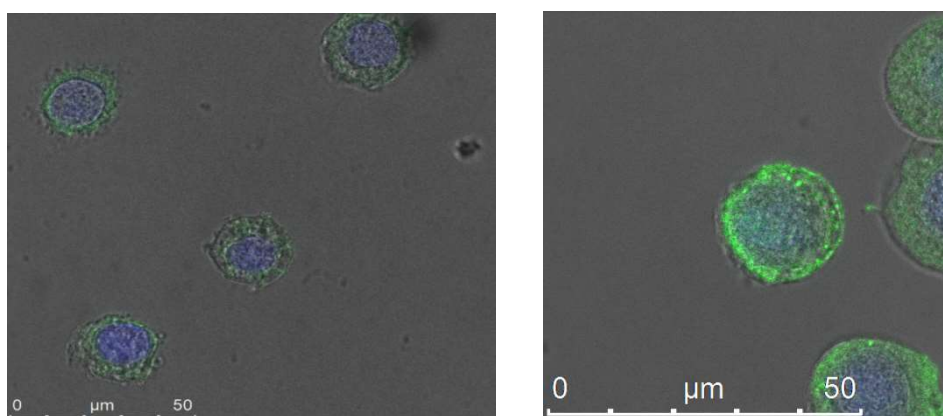


Figura 16. Localização da proteína recombinante pepGPV fusionada a GP64 na superfície de células de inseto Tn5B analisado em microscópio confocal a laser. O núcleo foi evidenciado em azul com o marcador DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). E a superfície em verde está indicando possivelmente a presença da proteína recombinante.

5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, houve uma redução da incidência de casos de raiva canina e raiva humana transmitida por cães na América Latina, em virtude, dos intensos programas nacionais de controle da raiva implantados em vários países, das vacinações massivas em cães, profilaxia pré e pós-exposição, melhorias no diagnóstico da doença e vigilância intensiva (Vigilato *et al.*, 2013).

Mas ainda é, de suma importância que os animais domésticos (cães e gatos) recebam a vacina contra a Raiva para que o ciclo urbano, que é caracterizado quando há presença do vírus entre essas espécies, não esteja circulante. Lembrando que o ciclo urbano representa 80% dos casos de raiva humana, tendo o cão como principal animal agressor dos casos de raiva humana, seguido do morcego e gato.

Como no Brasil, não há vacinas humanas aprovadas contra a raiva que se utiliza de vírus recombinante contendo um antígeno vacinal na sua superfície, e apenas vacinas pós-exposição de administração combinada com vírus inativado e soros hiperimunes, seja ela homóloga ou heteróloga é importante reforçar a vigilância (Brasil, 2017).

Diante desse contexto, o desenvolvimento de um potencial vacinal para humanos que venha imunizar a população de forma geral e com custos de produção baixos é de suma importância para o cenário atual.

A metodologia que vem sendo comumente utilizada envolve baculovírus que são usados para expressão de diversas proteínas em células de insetos, das mais simples até as mais complexas, inclusive das que precisam de modificações pós-traducionais específicas (Ribeiro, *et al.*, 2015). As proteínas expressas em células de inseto usando baculovirus recombinantes possuem, em sua maioria, atividades biológicas e imunológicas bem próximas às proteínas naturais. Além disso, esse sistema é capaz de coexpressar mais de dois genes, o que pode melhorar a expressão da proteína de interesse (Rohrmann, 2013).

Nossa estratégia envolveu a expressão de apenas parte da proteína GPV que foi fusionado à proteína GP64 de baculovírus que visa o endereçamento da proteína heteróloga na superfície da partícula viral (Yang *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2011). GP64 é a proteína do envelope viral dos AlfaBV responsável pelo reconhecimento dos receptores celulares e entrada na célula por endocitose (Rohrmann, 2013). Li e Blissard (2009) demonstraram que apenas algumas regiões da GP64 de AcMNPV são essenciais para que a proteína seja endereçada para a membrana da partícula viral. Portanto, o gene da proteína GP64 foi reduzido para conter as regiões codantes PS (peptídeo sinal), região que codifica o sinal para envio da proteína ao retículo endoplasmático da célula infectada, a

região TM (domínio transmembrana) é altamente conservada entre as GP64 de diferentes baculovírus e essencial para a função da proteína de fusão e DCT (domínio da cauda citoplasmática) essencial para o eficiente brotamento da partícula viral, e desta forma, a junção dessas três regiões temos a produção de uma GP64 “truncada” que ainda é endereçada para a o envelope da partícula viral e esse gene truncado pode atuar como vetor para fusão das proteínas de interesse.

Para tanto, neste trabalho, foi utilizado o gene da proteína GP64 de AgMNPV, por apresentar diferenças nucleotídicas nas regiões TM e DCT (Li; Blissard, 2009) e que pode diminuir a recombinação do gene GP64 selvagem de AcMNPV com o gene GP64 recombinante, visto que para a construção de baculovirus recombinante não há deleção do gene selvagem. Chaves (2016) utilizou essa estratégia para avaliar o potencial imunogênico de BV recombinantes contendo a GP64 fusionada a um peptídeo da proteína do envelope do vírus da febre amarela. O domínio III da proteína de envelope da febre amarela foi fusionada à GP64 de AgMNPV e AcMNPV e resultou na expressão de proteínas recombinantes que foram utilizadas para inocular camundongos para análise da resposta imunológica. O teste de proliferação de linfócitos indicou uma maior proliferação em camundongos inoculados com o vírus recombinante contendo o EDIII fusionado à proteína GP64 do baculovírus AgMNPV quando comparado com o controle LPS. Já o estudo de Yang *et al.* (2007), utilizou a proteína Hemaglutinina (HA) de Influenza aviária para expressão na superfície de BV de AcMNPV e obteve sucesso nesta estratégia. A proteína E (envelope) do vírus da encefalite japonesa também foi expressa na superfície de BV de baculovírus utilizando esse tipo de vetor. Estes BVs recombinantes produzidos foram capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, contra o vírus da encefalite japonesa em ratos (Xu *et al.*, 2011).

A GPV da raiva é o principal determinante antigênico do vírus, a qual interage com receptores das células hospedeiras durante a infecção e apresenta papel fundamental na sua neurovirulência (Lentz *et al.*, 1982; Morla; Makhija; Kumar, 2016). Estudos previos demonstraram que a GPV, presente no envelope viral, tem uma grande capacidade em induzir a produção de anticorpos neutralizantes e ativar as células do sistema imune, resultando em uma possível proteção contra a doença. Além disso, já se tem conhecimento sobre a região mínima dessa proteína que é responsável pelo maior reconhecimento do sistema imune.

Wu *et al.* (2014), construíram baculovirus recombinantes contendo o gene da GPV no intuito de desenvolver uma possível vacina contra raiva. Neste trabalho, um baculovírus recombinante (BV-RVG/RVG) foi pseudotipado e simultaneamente outro RVG foi expresso sob o controle do promotor *imediatamente early* citomegalovírus (CMV). Estes construtos foram capazes

de proteger 100% camundongos desafiados contra o vírus da raiva, apresentando níveis altos de anticorpos neutralizantes.

Niu *et al.* (2016) testou a capacidade de indução de resposta imunológica de 5 peptídeos de regiões alvos de anticorpos monoclonais neutralizantes para a GPV (Cai *et al.*, 2010; Dietzschold *et al.*, 1990; Houimel; Dellagi, 2009; Niederhauser *et al.*, 2008; Mansfield; Johnson; Fooks, 2004; Marissen *et al.*, 2004; Ni *et al.*, 1995) e 2 deles (AR16 e o HPAB) juntamente com o adjuvante Gp96 apresentou capacidades imunoestimulatórias em camundongos e cães, sendo forte candidata à produção de uma vacina contra a raiva.

Em nosso estudo uma sequência (CLKLCGVLG) descrita no trabalho de Marissen *et al.* (2005) de uma região da GPV reconhecida como alvo de anticorpos monoclonais neutralizantes (aminoácidos 218 a 240 da GPV) foi fusionada a GP64 de AgMNPV. A correta expressão deste peptídeo da glicoproteína G foi confirmada por *Western blot* no extrato total de células infectadas com o vírus recombinante, porém nas partículas de baculovírus recombinantes semipurificadas (BVs) não foi detectado a presença da proteína recombinante. Já na análise em microscópio confocal de células infectadas com o vírus recombinante vAccepGPV parece que a proteína recombinante está sendo encaminhada para a superfície celular. Como essa proteína foi fusionada com a proteína GP64 que é sabiamente endereçada à membrana antes do brotamento da partícula viral BV, uma vez na superfície de células infectadas, a proteína recombinante deveria ter sido corretamente incorporada à partículas BV que brotam através da membrana plasmática. Entretanto, isso não ocorreu.

Outra estratégia para expressão desse peptídeo é a fusão com o gene da poliedrina de baculovirus. Esta estratégia de fusão de proteínas com a poliedrina já foi utilizada para expressão de outras proteínas recombinantes (Ardisson-Araújo *et al.*, 2013). Entre as vantagens de se usar essa estratégia, está a alta expressão da proteína recombinante, visto que o gene heterólogo está sob comando do promotor da poliedrina, e facilidade de purificação das proteínas recombinantes que, na maioria das vezes, forma um corpo de oclusão facilmente separado por centrifugação em um gradiente de sacarose.

O estudo de Assis da Silva (2016), relatou a construção de um baculovirus recombinante contendo um peptídeo imunogênico derivado da glicoproteína do vírus da Raiva (Pept/G), fusionado a poliedrina do baculovirus AcMNPV. A proteína recombinante foi expressa em cultura de células de inseto e na forma de agregados protéicos cristalinos. Esta proteína foi capaz de estimular o sistema imune de camundongos com sucesso, verificado por meio da proliferação celular *in vitro*.

Porém, não foi possível observar níveis diferentes dos controles nas análises de IL-10, IFN- γ e TNF- α .

Em contrapartida, o sistema “display”, usado neste trabalho, tem como grande vantagem à praticidade, onde a própria partícula viral atua como antígeno vacinal, além de ser uma técnica considerada de baixo custo e segura, é atualmente reconhecido como uma importante ferramenta biotecnológica na produção de vacinas de subunidade (Rychlowska *et al.*, 2011). Além disso, o estudo de Bocca *et al.* (2013), reforça a importância de usar a GP64 de AgMNPV pois a análise de ativação de células T, revelou que BV são capazes de induzir a produção de IFN- γ , e aumentar a proliferação de células do baço, como também a resposta de células Th1 e assim são considerados eficazes como vetores de vacinação ou adjuvantes imunológicos. Ressalta ainda, que AgMNPV na forma selvagem ou recombinante, pode ser também utilizado para alterar o tipo de resposta adaptativa desenvolvida.

Desta forma, como não detectamos a expressão da proteína, apenas evidenciamos que ela é endereçada a partícula BV, o trabalho não foi continuado, visto que percebemos que é necessário reformular a metodologia para que essa proteína seja expressa e tenhamos a confirmação do seu endereçamento à partícula BV do baculovírus.

Capítulo II

Expressão da proteína de envelope do vírus da febre amarela fusionada a poliedrina de um baculovirus e sua análise como candidata a vacina recombinante

Introdução geral

1. Arbovírus

As arboviroses são um crescente problema de saúde pública no mundo principalmente pelo potencial de dispersão, pela capacidade de adaptação a novos ambientes e hospedeiros (vertebrados e invertebrados), possibilidade de causar epidemias extensas. Os arbovírus são vírus transmitidos a diferentes hospedeiros, tais como mamíferos, pássaros e répteis, através de um vetor artrópode hematófago. O ciclo de transmissão enzoótica requer interação temporal entre o vírus, o vetor e o hospedeiro, e está representado na figura 18 (Fauci; Morens, 2016).

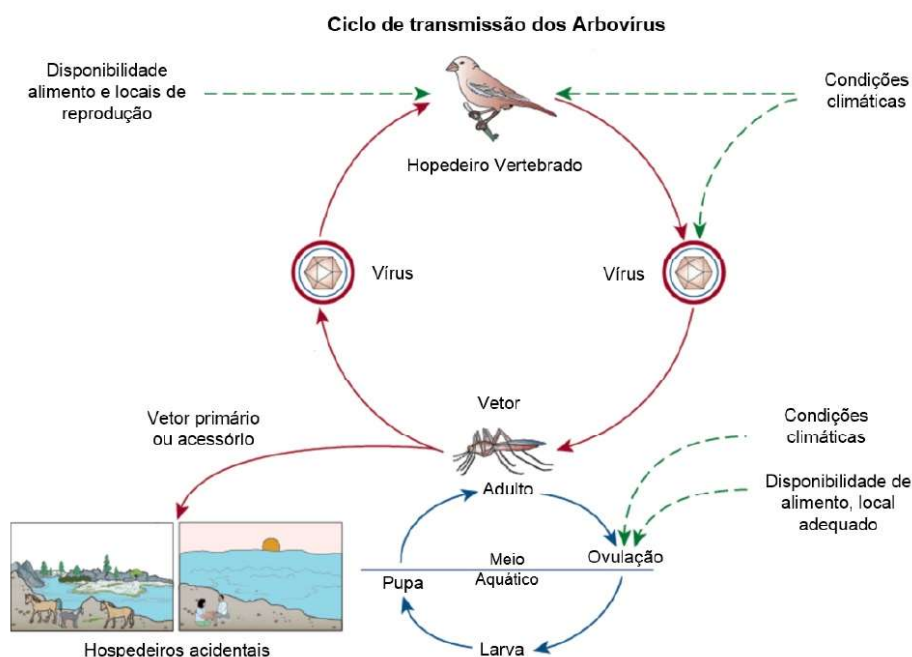


Figura 18. O ciclo de transmissão enzoótica requer interação temporal entre o vírus, o vetor e o hospedeiro, permitindo a aquisição viral a partir de um hospedeiro infectado por um vetor susceptível e capaz de transmitir o vírus por sua saliva para um novo hospedeiro (Fonte: Fumagalli, 2018).

A maioria dos arbovírus pertence aos gêneros *Alphavirus* (família *Togaviridae*), *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), *Peribunyaviridae*, *Nairoviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (Weaver; Rensen, 2010). Portanto, os arbovírus, com exceção daqueles da família *Asfaviridae*, são vírus de RNA mantidos na natureza através de ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes, principalmente mosquitos e carrapatos, que se alimentam do sangue de animais hospedeiros, como pássaros e mamíferos (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2006).

Esses vírus têm uma distribuição geográfica bastante ampla, abrangendo todos os continentes, tanto nas regiões temperadas como nas tropicais, com predominância nestas últimas, certamente por oferecerem condições ecológicas mais favoráveis. Nos trópicos, os vetores coexistem com os hospedeiros vertebrados em todas as estações do ano, ao passo que, nos países de clima temperado, o ciclo de transmissão é interrompido durante o inverno, reiniciando-se na primavera ou verão (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2006). A floresta amazônica é uma das maiores reservas de arbovírus do mundo, não só devido às condições climáticas favoráveis, mas também à grande diversidade da fauna, com abundante variedade de artrópodes hematófagos e vertebrados silvestres, que constituem elementos fundamentais para a manutenção desses vírus. Estima-se que haja mais de 545 espécies de arbovírus, dos quais, pelo menos 210 tipos, foram isolados no Brasil, dentre eles, 196 foram identificados inicialmente na Amazônia brasileira, sendo muitos destes exclusivos dessa região (Medeiros *et al.*, 2013).

Em humanos, esses vírus causam doenças clinicamente significantes, entre elas, alphavirose, como Chikungunya, e, flavivirose, como Dengue, Febre Amarela (FA) e Zika. Essas viroses co-evoluíram com mosquitos essencialmente pertencentes ao subgênero *Stegomyia*, de *Aedes*, do qual a espécie mais disseminada é o *Aedes aegypti* (Fauci; Morens, 2016). Esse mosquito é encontrado em todos os estados do Brasil. As temperaturas altas o ano todo e grande umidade oferecem condições favoráveis para a disseminação desses vetores, que ocorrem em todas as estações do ano. A simultânea circulação de arbovírus no país favoreceu o aparecimento de diversas epidemias, com milhares de pessoas sendo infectadas todos os anos (Medeiros *et al.*, 2013).

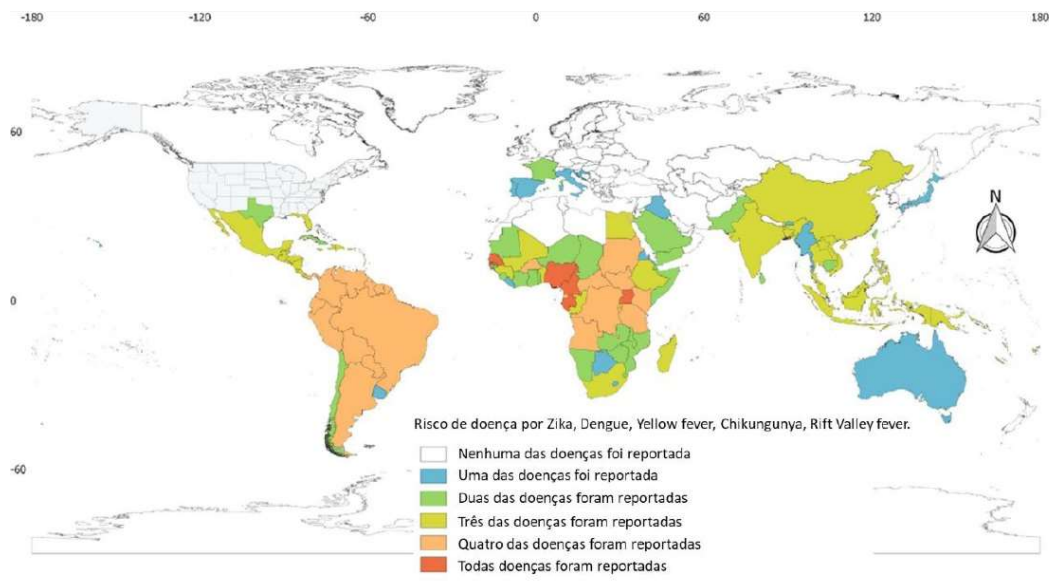


Figura 17. Panorama da distribuição mundial de casos de Dengue, Zika, Febre amarela, Chikungunya relatados até 2018. O mapa mostra as ocorrências das arboviroses selecionadas, sem ocorrência, mostradas em branco, para a ocorrência de todas as doenças as arboviroses selecionadas, mostradas em vermelho. Adaptado de (Leta *et al.*, 2018).

O número total de países ou territórios que relataram ocorrências autóctones transmitidas por vetores até 2018 foi de 85 para Zika, 111 para dengue, 106 para Chikungunya e 43 para FA. A maioria desses países estão localizados em partes tropicais e subtropicais do globo, o que coincide com áreas de maior incidência do mosquito vetor. Além disso, a ocorrência de pelo menos uma das arboviroses consideradas foi relatada em 146 (58,4%) países ou territórios, dos quais 123 (49,2%) relataram múltiplas doenças (Figura 17.) (Leta *et al.*, 2018).

A transmissão de DENV, ZIKV, FA e CHIKV ocorre principalmente em áreas urbanas e peri-urbanas - geralmente consistindo em distritos grandes e heterogêneos. Dessa forma, torna-se necessário uma ferramenta que identifique áreas prioritárias de ação, particularmente onde as intervenções devem começar, e idealmente inclui um teste rápido de diagnóstico capaz de distinguir entre as diferentes doenças transmitidas pelo *Aedes* (Olliaro *et al.*, 2018).

1.1. Gênero flavivírus

Os flavivírus são interessantes objetos de estudo por serem vírus que circulam em diferentes hospedeiros, na sua maioria, primatas não humanos, humanos, aves e insetos. Portanto, precisam ter características biológicas de adaptação aos organismos pelos quais circulam. A variedade de vetores também favorece a introdução desses vírus em novos

ambientes. A distribuição geográfica dos flavivírus mostra que existem áreas endêmicas de flavivírus distribuídas no mundo inteiro (Holbrook, 2017).

Os flavivírus constituem um gênero de vírus de RNA pertencente à família *Flaviviridae*. Esses vírus têm entre 40-60 nm de diâmetro, formato esférico e contêm um envelope lipídico. O capsídeo é composto por uma única proteína e um envelope que contêm duas ou três proteínas de membrana codificadas pelo vírus (King *et al.*, 2012).

Os flavivírus têm como espécie diferenciada o vírus da FA e como característica distinta a presença de um *cap* tipo I (m7GpppAmp) na extremidade 5' do genoma, que não aparece em outros gêneros que confere a esta molécula maior estabilidade, protegendo-a da ação de fosfatases e nucleases. Além de aumentar as chances desse RNA ser capturado pelos sistemas eucarióticos de tradução, levando uma maior produção de proteínas. O genoma é composto por, aproximadamente, 11 Kb de RNA fita simples de senso positivo. O RNA genômico representa o único RNA mensageiro viral nas células infectadas e consiste em uma ORF única de mais de 10.000 nucleotídeos, a qual codifica para todas as suas proteínas, tanto estruturais quanto não estruturais, e é flanqueada por regiões não-codantes nas extremidades 5' e 3' (King *et al.*, 2012).

Duas formas virais podem ser distinguidas: vírus maduros, que contêm duas proteínas (E, de envelope e M, de membrana) associadas à membrana e codificadas pelo vírus, e, vírus imaturos intracelulares, que contêm o precursor de membrana (prM) ao invés de M, o qual é proteoliticamente clivado durante a maturação (King *et al.*, 2012).

O ciclo replicativo desses vírus inicia-se com a ligação com o receptor na superfície celular. Após a adsorção, a partícula é endocitada em vesículas recobertas por clatrina. O baixo pH do endossoma induz a fusão do envelope do vírus com a membrana celular, provocando mudanças conformacionais na proteína E. Após isso, o nucleocapsídeo, e, subsequentemente, o genoma, são liberados no citoplasma, onde ocorre a replicação viral. Interações que envolvem as pequenas proteínas hidrofóbicas não estruturais (NS's), o RNA viral, e, presumivelmente, alguns fatores do hospedeiro são fundamentais neste processo. A síntese de uma fita de RNA de polaridade negativa é a primeira etapa da replicação do RNA genômico. Essa fita, por sua vez, servirá de molde para novas fitas de RNA de polaridade positiva. A finalização do ciclo replicativo ocorre com a montagem das novas partículas virais, próxima ao retículo endoplasmático, onde o nucleocapsídeo é envelopado. A liberação de novas partículas virais sucede, principalmente, por exocitose (Lindenbach; Thiel; Rice, 2007).

Cerca de 40 espécies de flavivírus são consideradas arbovírus, sendo algumas causadoras de encefalites e outras de febres hemorrágicas em humanos e animais. Destacam-se nesse grupo os vírus da FA, Dengue e Zika (King *et al.*, 2012; Lopes; Linhares; Nozawa, 2014).

E, desde 2016, o Brasil vem enfrentando a disseminação dos vírus zika, chikungunya e FA, propiciando uma maior mobilização para vigilância epidemiológica de forma aprimorar a acurácia de diagnóstico e predição de novos surtos e epidemias.

1.2. Febre amarela

A FA é uma doença causada pelo vírus da FA transmitida para humanos pelo mosquito *Aedes aegypti*, na forma urbana da doença. Esta doença é endêmica em países de clima tropical e subtropical (Staples; Gershman; Fischer, 2010).

A FA causou um número extenso de mortes no século XVII, com as principais manifestações clínicas de febre e icterícia. O Brasil foi atingido pela primeira vez no final do século XVII por uma epidemia devastadora no nordeste do país. No século XVIII não houve registros de epidemias de FA, mas no século seguinte, a doença ressurgiu sob forma epidêmica e endêmica. É possível observar que esta é uma doença de grande importância histórica, e que atualmente continua a ser uma ameaça a viajantes e residentes de áreas endêmicas, apesar da disponibilidade de uma vacina eficaz por quase 70 anos (CDC, 2019).

A OMS considera três tipos de ciclos de transmissão: transmissão silvestre que ocorre em florestas tropicais onde os mosquitos (*Aedes*, *Haemogogus* e *Sabethes spp.*), se alimentam de macacos virêmicos. Já a transmissão urbana geralmente ocorre em surtos em grandes cidades, onde mosquitos *A. aegypti* infecta pessoas com imunidade baixa ao vírus. Por fim, há um tipo intermediário de transmissão que interliga os ciclos silvestre e urbano que envolve mosquitos (*Aedes spp.*) semi-domésticos (Monath; Vasconcelos, 2015).

Embora se tenha uma vacina eficaz (17D) disponível no mundo, o vírus ainda causa grandes surtos, como ocorreu no Brasil entre dezembro de 2016 e março de 2018, onde houve mais de 2000 casos confirmados, incluindo mais de 500 mortes (Who, 2018). Faria, (2018) realizou um estudo potencial de mapeamento da incidência viral em tempo real, que consegue detectar a origem e a circulação do vírus. Este determinou que o surto teve origem no nordeste do Brasil e se estendeu ao sul, no qual, a maioria dos casos relatados foi no estado de Minas Gerais e Espírito Santo, e alguns casos no estado do Rio de Janeiro, áreas onde o vírus nunca tinha sido encontrado anteriormente. E surpreendentemente, detectou que o vírus circulou a

uma velocidade de 4,25 km/dia, o que provavelmente explica a magnitude do surto. Outros fatores que explicam essa reincidência de casos é a diminuição da imunidade da população à infecção, da colonização de ambientes silvestres, dos movimentos migratórios humanos e das mudanças climáticas (Who, 2018). De acordo com o boletim epidemiológico de julho de 2018 a 7 de fevereiro deste ano, foram notificados 834 casos suspeitos de FA, sendo que 679 foram descartados, 118 permanecem em investigação, 37 foram confirmados e destes, 9 foram à óbito (MS, 2019).

A infecção pelo vírus da FA pode se manifestar de forma assintomática, leve ou moderada, grave e maligna dentro de 3 a 6 dias após serem picados pelo mosquito infectado. No caso da forma maligna, o desenvolvimento da doença ocorre em três fases: a fase de infecção, a fase de remissão e a fase de intoxicação. Na primeira fase, a doença se manifesta em sintomas similares aos da gripe, com dores musculares, febre e mal-estar. A fase de remissão é inexistente em alguns casos, mas quando ocorre é caracterizada por um período curto de 2 a 24 horas onde os sintomas parecem desaparecer. Após essa fase, o período de intoxicação evolui para falência hepática e renal, icterícia, náusea e vômito negro, e outras manifestações hemorrágicas. Pacientes terminais ainda podem apresentar sinais de comprometimento neurológico, incluindo alucinações, convulsões e coma. Os sintomas neurológicos são provavelmente ocasionados pela resposta inflamatória generalizada e aumento da permeabilidade vascular no cérebro, a duração da doença é variável e a letalidade é de 20 a 50% (Vasconcellos, 2003; Monath, 2001).

O diagnóstico é realizado por isolamento do vírus de amostras de sangue ou de tecido hepático, por detecção de antígeno em tecido (imunohistoquímica e imunoperoxidase) ou por sorologia. Esses últimos são métodos complementares aos primeiros e as técnicas utilizadas são de captura de IgM (MAC- ELISA), inibição de hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC) e neutralização (TN). O MAC-ELISA, na maioria dos casos, permite o diagnóstico presuntivo com uma única amostra de soro, pois é bastante sensível para detecção de IgM, dispensando o pareamento do soro (Brasil, 2019).

As reações cruzadas entre o FA e outros *flavivirus* são fatores que dificultam o diagnóstico sorológico, principalmente em áreas endêmicas de múltiplos *flavivirus* (Monath, 2001). Quando o objetivo é subsidiar as ações da vigilância epidemiológica e de controle de vetores, o prejuízo causado pela emissão de um resultado falso-positivo é menor do que aquele causado pelo falso-negativo. Por isso, a escolha por um teste diagnóstico deverá sempre levar em consideração a alta sensibilidade (Blacksell, Jarman, Bailey, 2011).

A vacina da FA é considerada uma das mais seguras e eficazes na atualidade. Apesar de ter sido desenvolvida há 80 anos, a vacina é a principal medida de controle contra a FA. A vacina da FA 17D promove proteção de longa duração com administração em única dose, estimulando a resposta imune inata e adaptativa, com produção de anticorpos neutralizantes e de células T de memória central e efetora. Assim, a vacinação contra FA é eficiente na ativação da resposta imune celular e humoral, e pode conferir proteção por mais de 30 anos (Monath, 2005).

Como a vacina é produzida com vírus atenuado, não é recomendada a vacinação de pessoas com imunodeficiência, já que há riscos de reversão da virulência num hospedeiro com depressão do sistema imune (Vasconcelos, 2003). Além disso, o vírus é cultivado em embriões de galinha, e a vacina pode conter proteínas de ovo, o que pode ser prejudicial para pessoas com hipersensibilidade a proteínas de ovo (Chernin; Swender; Hostoffer, 2011).

Desta forma, o uso de vacinas baseadas em proteínas recombinantes para proteger as pessoas contra doenças está crescendo devido aos benefícios relacionados à técnica de produção. Geralmente, as vacinas baseadas em proteínas recombinantes são mais seguras como no caso de vacinas envolvendo baculovírus, não há risco destes vírus se replicar em células de mamíferos, e mais fáceis de se produzir por se utilizar de cultivo de células de inseto sendo desta forma uma boa alternativa em comparação às vacinas de vírus atenuado (Galler *et al.*, 2001; Whitaker; ovsyannikova; Poland, 2015). Além disso, todas as limitações e reações adversas, identificadas em alguns grupos vacinais poderiam ser evitadas. Portanto, vários estudos estão sendo realizados utilizando proteínas imunogênicas ou regiões proteicas (vacinas de subunidades) para o desenvolvimento de vacinas alternativas (Fan *et al.*, 2013 e Coconi-Linares, *et al.*, 2013).

O vírus da FA é o vírus protótipo do gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*). Desta maneira, é o modelo utilizado para elucidar a organização genômica e a estratégia de replicação dos flavivírus, assim como para estudos sobre a base molecular das estruturas, funções antigênicas e virulência (Volk *et al.*, 2009).

O genoma viral deste vírus é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva e possui um único quadro aberto de leitura. A tradução do RNA genômico gera uma poliproteína viral que é processada co-e-pós-traducionalmente pela protease viral ou pelas proteases celulares, liberando as proteínas virais que desempenharão sua função no ciclo replicativo viral (Fields; Howley; Griffin, 2007). O genoma viral codifica três proteínas estruturais (Pr/M, C e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A e B, NS3, NS4A e B e

NS5). A proteína Envelope (E) é responsável pela entrada da partícula viral na célula hospedeira e o principal alvo da resposta imune (Monath, 2001).

A glicoproteína E é responsável pela fusão do envelope do vírus á membrana do endossomo e participa da dissociação do nucleocapsídeo no citoplasma (Piccini; Castella; Damonte, 2015). E esta proteína se dispõe na superfície viral na forma de dímeros. Cada monômero é formado por um domínio transmembrana altamente hidrofóbico (regiões de haste a âncora) na porção C-terminal e um ectodomínio composto pelos domínios I, II, III que representam 80% da proteína (Zhang *et al.*, 2003). O Domínio I (EDI) se dispõe centralmente na proteína e contém vários sítios antigênicos. O domínio II (EDII) é responsável pelo processo de dimerização da proteína E (Figura 19.). O domínio III (EDIII) localizado na porção C-terminal da proteína e possui os epítomos reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes e é comumente estudado como uma região proteica imunogênica para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade FA (Brinton, 2002).

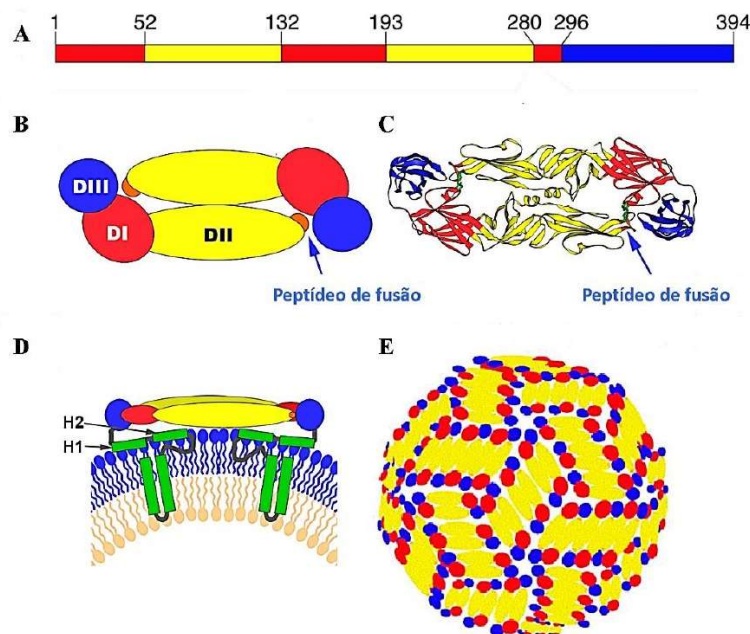


Figura 19. Representação da proteína E e seus domínios. (A) Esquema dos aminoácidos que compõem o ectodomínio da proteína E. Estão representados os domínios I (vermelho), II (amarelo) e III (azul) e o peptídeo de fusão (laranja). (B-C) Organização dos dímeros do ectodomínio da proteína E. (D) Configuração do ectodomínio e representação das regiões haste/âncora (verde) em relação à bicamada lipídica. (E) Conformação dimérica da proteína E presente na superfície das partículas virais maduras (Adaptada de Stiasny; Heinz, 2006).

Tradicionalmente, trabalhos em modelo murino mostraram que o domínio da proteína do vírus da febre amarela (EDIII) contém a maioria dos epítomos reconhecidos por anticorpos

homotípicos com alto potencial neutralizante, sendo considerado principal indutor desta resposta (Shresta *et al.*, 2010; Coconi-Linares *et al.*, 2013; Poggianela *et al.*, 2015). Por sua vez, anticorpos direcionados aos domínios I (EDI) e II (EDII) seriam pouco neutralizantes, apresentando reação cruzada com outros sorotipos. Além disso, a utilização de teste imunoenzimático para a detecção de IgM circulante durante a infecção viral só é eficaz a partir do quinto dia após o início dos sintomas, quando os títulos de anticorpos IgM são evidenciados.

A proteína E compõe o envelope viral, portanto, sua disposição sobre a membrana lipídica viral durante a montagem do vírus é essencial para a formação de partículas virais viáveis. A montagem viral no retículo endoplasmático resulta em uma partícula viral imatura, na qual a proteína E está sob forma dimérica, complexada com a proteína prM. Além disso, os heterodímeros prM:E formam trímeros para compor o envelope viral da partícula imatura (Mukhopadyay; Kuhn; Rossmann, 2005). Nesta conformação, a α -hélice H1 está parcialmente inserida na membrana viral e determina a curvatura da membrana do vírus, além de estabilizar a conformação do arranjo heterodimérico prM:E (Zhang *et al.*, 2013). Durante o transporte da partícula viral pela rede trans do Golgi, a clivagem da prM promove a reorganização da proteína E em homodímeros, como é encontrada na partícula viral infectiva. Essas mudanças conformacionais são majoritariamente desempenhadas pelas interações entre a α -hélice H1 e o ectodomínio da proteína E (Lin *et al.*, 2011).

Neste estudo, o EDIII de FA será fusionado ao gene *polh* da principal proteína (poliedrina) do corpo de oclusão do baculovirus AcMNPV visando a produção de uma proteína recombinante que pode ser usada como uma alternativa candidata à vacina contra o vírus FA.

3. OBJETIVO

Expressão da proteína imunogênica EDIII do vírus da FA fusionada à poliedrina de um baculovírus e sua análise como candidata a vacina recombinante.

3.1. Metas

- Clonagem do gene EDIII, no vetor de transferência;
- Construção de baculovirus recombinante e expressão da proteína recombinante em células de inseto;
- Purificação das proteínas recombinantes produzidas
- Avaliação do perfil imunológico de camundongos imunizados com a partícula e proteína recombinante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Virus e células

Células *E. coli* DH10 Bac que contém o genoma do vírus do AcMNPV na forma de um grande plasmídeo (bacmídeo bMON14272) (Bac-to-Bac® “Baculovirus Expression System, Invitrogen) foram utilizadas nesse trabalho e mantidas a -80° C.

O vírus selvagem AcMNPV isolado L-1 (Lee; Miller, 1978) e o recombinante construído neste trabalho foram propagados em cultura de células derivadas de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4 ou Tn5B) que foram mantidas em meio TC-100 (HIMEDIA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e uma solução antibiótica/antimicótica a 1% (100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B) (Gibco) a 28°C (Granados *et al.*, 1994).

Células Sf9 - ET (“*Easy Titer*”) derivadas de *Spodoptera frugiperda* foram utilizadas para titulação dos vírus utilizados neste trabalho (Hopkins; Esposito, 2009) e mantidas como descrito para as células Tn5B.

Células de *E. coli* DH5- α (Invitrogen) foram utilizadas como hospedeiras para o plasmídeo utilizado neste presente trabalho.

4.2. Construção do vetor de transferência contendo o cassete gênico EDIII fusionado ao gene da poliedrina

O plasmídeo pFASTBACI-6xHis-AcPH (Ardisson-Araújo, 2015) foi utilizado para a construção do plasmídeo que contém o EDIII fusionado ao gene da poliedrina. Esse plasmídeo possui o promotor da poliedrina, o gene da poliedrina e uma cauda de seis histidinas, além de um sítio para enzima de restrição *Nco* I, que foi utilizado para clonagem do EDIII, apresenta gene de resistência a Ampicilina (Amp), gene de resistência a Gentamicina (Gm), regiões de transposição Tn7R e Tn7L, origem de replicação PUC e origem de replicação fl (esse plasmídeo possui duas origens de replicação para gerar um maior número de cópias).

O plasmídeo pFASTBACI-6xHis-AcPH foi digerido com *Nco* I (0,5 µg de DNA plasmidial, 2 µl do tampão de reação 10X (Promega), 2 µl do tampão de BSA (albumina de soro bovino) (Promega), 1U (unidade) da enzima *Nco* I e água “milli-Q” para um volume final de 20µl). Após a digestão, o vetor foi desfosforilado, utilizando os 20 µl de DNA plasmidial digerido e 1 µl da enzima TSAP (Fosfatase alcalina termo-sensível - Promega), seguindo especificações do fabricante. A reação foi incubada 15 min a 37°C e 15 min a 70°C. O fragmento

EDIII foi retirado do plasmídeo pGEM GP64EDIII6xHisAc, que foi utilizado como molde para uma reação de PCR utilizando os primers YFEDIIIPOLFPCIIF (5'-ACATGTCAAGGGGACATCCTACAA-3') e YFEDIIIPOLFPCIIR (5'-ACATGTTTTGTGCCACTGGTAAGTGA-3'). Esses primers amplificaram somente o fragmento EDIII e acrescentaram sítios para enzima de restrição *Pci* I flanqueando o gene (2,5 µl do tampão de reação 10X da enzima Taq DNA polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase Kit), 0,75 µl de MgCl₂ (solução estoque 50 mM), 0,5 µl da mistura dos quatro dNTPs (solução estoque 10mM), 0,5µl do oligonucleotídeos YFEDIIIPOLFPCIIF e YFEDIIIPOLFPCIIR (solução estoque 10µM), 1µl do DNA – pGEM GP64EDIII6xHisAc (~60 ng/µl), 2U (unidades) da enzima Taq DNA polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase) e água “milli-Q” para um volume final de 25 µl). O seguinte programa foi utilizado: 94°C/1 min s, 30 ciclos de 94°C/30 s, 55°C/30 seg, 72°C/1 min e 72°C/2 min para o término da extensão. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0.8% de acordo com o protocolo descrito em Sambrook; Fritsch; Maniatis, (1989). O fragmento de DNA com o tamanho esperado (310 bp), correspondente ao fragmento EDIII e os nucleotídeos adicionados pelos oligonucleotídeos, foi extraído do gel, eluído e purificado com o Kit GFX DNA and Gel Band Purification (GE) segundo instruções do fabricante. Após eluição esse fragmento de DNA foi utilizado em uma reação de digestão utilizando 0.5 µg de fragmento de DNA, 2 µl do tampão de reação 10X (Promega), 2 µl do tampão de BSA (albumina de soro bovino) (Promega), 1U (unidade) da enzima *Pci* I e água “milli-Q” para um volume final de 20 µl. Após digestão o fragmento foi novamente extraído do gel, eluído e purificado com o Kit GFX DNA and Gel Band Purification (GE) segundo instruções do fabricante.

O plasmídeo pFASTBACI-6xHis-AcPH digerido e desfosforilado foi utilizado em reação de ligação com o fragmento EDIII utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega) seguindo protocolo do fabricante. Foi realizada uma transformação por choque térmico (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989). Para essa transformação foram utilizadas células *E. coli* DH5α quimio-competentes comerciais. Os clones resultantes foram selecionados pela resistência aos antibióticos ampicilina e gentamicina. Posteriormente, foi feita uma purificação por lise alcalina (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989). A confirmação da obtenção do plasmídeo pFASTBACI-6xHis-AcPH EDIII foi feita por sequenciamento (Macrogen, Coréia do Sul).

4.3. Construção e titulação do vírus recombinante contendo a proteína EDIII da FA, fusionada à proteína do corpo de oclusão (poliedrina) de baculovírus

O vetor de transferência recombinante construído foi utilizado para construção dos baculovírus recombinantes, utilizando o sistema Bac-to-Bac® “*Baculovirus Expression System*” (Invitrogen). Foram utilizadas células *E. coli* DH10Bac que possuem o bacmídeo, o genoma completo de baculovírus em forma de um grande plasmídeo, e um plasmídeo chamado *Helper*, que codificam enzimas transposases, capazes de reconhecer sítios de transposição do vetor de transferência e o bacmídeo, para que o gene de interesse seja transposto do vetor de transferência para o bacmídeo.

Após a transposição, o bacmídeo propaga-se em células *E. coli* DH10Bac™ que são mantidas em -80°C como um grande plasmídeo que confere resistência a Canamicina. Dessa forma a bactéria pode ser cultivada em meio LB (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989) para posterior extração de DNA e subsequente transfecção de células de inseto. Assim, serão geradas as partículas infecciosas de baculovirus recombinantes (Luckow *et al.*, 1993).

Para a construção dos baculovírus recombinantes, 1µg do DNA plasmidial da célula DH10Bac™ contendo o bacmídeo recombinante, foi utilizado para transfectar células de inseto BTI-Tn5B1-4. Foram adicionados 250 µl de meio de cultura TC-100 sem soro (Vitrocell) no DNA plasmidial (bacmídeo) em uma placa de 35 mm (TPP). A mesma diluição foi realizada com 10 µl de lipossomos (Cellfectin®, Invitrogen). Os dois sistemas foram misturados e incubados por 15 min à temperatura ambiente. O meio de cultura da placa de células foi, posteriormente, substituído por 500 µl da mistura DNA/lipossomos, possibilitando a cobertura da monocamada de células. Após 3 h de incubação da placa, à temperatura ambiente, foi retirado a mistura DNA/lipossomos e foram adicionados 1,5 ml de meio de cultura TC-100 contendo 10 % de soro fetal bovino e as células incubadas a 28°C por sete dias. Posteriormente, o sobrenadante da placa de transfecção foi utilizado para a amplificação dos baculovírus recombinantes em uma nova placa de 100 mm (TPP) contendo 5x 10⁶ células de inseto BTI-Tn5B1-4. As células de inseto que foram transfectadas com o DNA do baculovirus recombinante foram capazes de produzir vírus, pois é sabido que o DNA nu do baculovirus é infectivo (Burand; Summers; Smith, 1980). Após este período, a infecção foi analisada em microscopia de luz (Axiovert 100, Zeiss) que permitiu avaliar a morfologia celular e assim registrar em 72 h. p. i. a infecção pelo baculovírus em células Tn5B. Nesta etapa comparamos

células de insetos (Tn5B normal) com células infectadas com AcMNPV, v6xHisPolh e v6xHisPolh-EDIIIFA.

Todos os vírus utilizados nesse trabalho foram titulados utilizando o método de diluição seriada em placa de 96 poços (“*End-point dilution assay*”) descrito a seguir. Células Sf9 – ET, possuem o gene da proteína verde fluorescente (eGFP) sob o controle do promotor da poliedrina de baculovírus integrado no seu genoma. Quando usadas no ensaio de titulação, as células Sf9 - ET ficam verdes quando são infectadas com baculovírus devido à ativação do complexo promotor de poliedrina/eGFP por produtos de genes de baculovírus expressos durante a infecção. Usando um ensaio de diluição seriada em placa de 96 poços, os títulos de baculovírus podem ser determinados em três dias usando um microscópio de fluorescência (Hoopkins; Sposito, 2009). Desta forma, por meio de diluições seriadas dos estoques virais coletados dos sobrenadantes das células infectadas foi realizado o ensaio em placas de 96 poços ‘Tissue culture flasks’ (TPP) contendo monocamada de células Sf9-ET na concentração de 1×10^4 células/ml com meio TC-100 (Vitrocell) seguido de incubação a 25°C por 2 hs para aderência das células na placa. As células aderidas foram infectadas com 8 diluições virais seriadas (10^1 a 10^8) dos vírus testados e incubadas durante 3 dias em estufa a 25°C. Entre 3 - 7 dias após a inoculação, os poços que possuíam células fluorescentes (positivas para expressão de eGFP) foram marcados e contados. O número de poços considerados positivos (que possuíam células fluorescentes) para a infecção em cada diluição, foi usado para calcular a titulação dos vírus utilizando o método descrito em Reed & Muench, 1938.

4.4. Análise da expressão da proteína recombinante

4.4.1. SDS-PAGE e *Western-blot*

A confirmação da expressão das proteínas recombinantes foi feita analisando-se os extratos de células Sf9 infectadas pelos vírus recombinantes em gel SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970), utilizando o aparato Mini Protean II (BioRad) e por *Western blot*, utilizando o anti-soro monoclonal anti-His (GE). Para este procedimento, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-His (GE), seguindo o protocolo abaixo: Foram feitos dois géis, usando o aparato Mini Trans-Blot Cells de acordo com o protocolo de instruções do fabricante (Bio-Rad). Um dos géis foi corado e fixado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético, 0,1% de corante Azul brilhante de Coomassie R-250 por 4 h, com leve agitação. O outro foi utilizado para transferência das proteínas em uma membrana de nitrocelulose (Gibco BRL- Life Technologies) para o experimento de imunodeteção de proteínas (*Western blot*) como descrito

abaixo. Com o auxílio do aparato de transferência Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad), as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose. As instruções foram seguidas de acordo com o protocolo do fabricante. Foi utilizado tampão de transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48mM de Tris, 39mM de glicina, 20% de metanol, pH 9,2). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de PBS 1X e 3% de leite em pó desnatado por 16 h. Depois, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS Tween (0,05%) por 5 min para retirar toda a solução de bloqueio. Adicionou-se uma solução de PBS/albumina bovina (BSA) 0,5% com o anticorpo primário monoclonal anti-His (GE Healthcare) produzido em camundongos por 1 h. A seguir, a membrana foi lavada novamente 3 vezes em PBS Tween (0,05%) por 5 min e incubada em PBS/BSA 0,5% com o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo, conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) por mais 1 h sob agitação. Retirou-se a solução, membrana foi lavada 3 vezes com PBS Tween (0,05%) e 1 vez com o tampão da enzima fosfatase alcalina por 5 min. A solução reveladora, NBT/BCIP (Invitrogen) foi adicionada servindo de substrato para a ação da fosfatase alcalina. O sistema foi mantido protegido da luz até a metabolização do substrato marcando, assim, a proteína de interesse devido à presença da enzima conjugada ao anticorpo secundário que se ligou ao anticorpo primário específico. Por fim, a reação foi interrompida com lavagens de água destilada evitando a marcação inespecífica. A infecção com os baculovírus recombinantes e análise morfológica de células BTI-Tn5B1-4 foram analisadas utilizando microscopia de luz (Axiovert 100, Zeiss).

4.5. Purificação das proteínas recombinantes

O pellet das células *Sf9* infectadas com os vírus recombinantes v6xHis-Polh (Ardisson-Araújo *et al.*, 2013) e v6xHisPolh-EDIIIYF, bem como com o baculovírus selvagem AcMNPV L-1 (controle), foram lavadas 3 vezes com a solução PBS 1X, e em cada etapa de lavagem as células foram coletadas e centrifugadas à 2000 rpm por 5 min à 4°C. Na última lavagem o pellet foi ressuspenso em tampão TE 1X (10 mM Tris pH 8 and 1 mM EDTA). Em seguida, estas células com TE foram sonicadas (Bandelin Sonoplus) quatro vezes de 15 s na velocidade de 100%, após as amostras foram centrifugadas à 2000 rpm por 5 min. O pellet foi tratado com solução de Triton 5% e centrifugado à 2000 rpm por 5 min, por 2 vezes. Após, os pellets foram tratados com uma solução de SDS 0,25% e centrifugados à 2000 rpm por 5 min, por 2 vezes. Por fim, estes foram tratados uma única vez com solução NaCl 0,5 M e centrifugados 2000 x g por 5 min, estes foram ressuspenso em solução PBS 1X e incubados a -20° C para futuras análises.

4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Células Tn5B ($5,0 \times 10^6$) foram infectadas com AcMNPV (MOI 1), vAc6xHis-Polh e vAc6xHis-PolhEDIIIYF. A análise morfológica das células infectadas pelo AcMNPV e os baculovirus recombinantes foram visualizadas em microscópio de luz (Axiovert 100, Zeiss). Na sequência essas proteínas recombinantes foram purificadas conforme item 4.5. Para análise em microscópio eletrônico de Varredura (MEV) estas amostras foram colocadas em acetona 100% e mantidas em estufa a 37° C por 1 h. Logo após, estas foram espalhadas em stub e recolocadas na estufa a 37° C por 30 min até sua secagem completa. Em seguida, estas amostras foram revestidas com ouro no Sputter Coater (Balzers) e observadas no MEV (Jeol JSM 840A à 10 kV).

4.7. Imunização de camundongos

Camundongos BALB/c (fêmeas de oito semanas de idade) foram adquiridos da Universidade de Campinas (Cemib, Unicamp, Brasil) e mantidos no biotério do Instituto de Biologia, da Universidade de Brasília, com livre acesso à dieta padrão e água. Os camundongos foram divididos em quatro grupos ($n = 5$ em cada grupo) e imunizados subcutaneamente com (i) PBS (500 μ L); (ii) 6xHis-Polh purificada (50 μ g/dose), (iii) proteína recombinante 6XHis-PolhEDIIIYF (50 μ g/dose) e (iv) vacina contra febre amarela 17DD (500 UFP - 500 μ L). Os camundongos foram imunizados 3 vezes em intervalos de 15 dias, depois eutanasiados 15 dias após a última imunização, com exceção do grupo vacinado com o vírus 17DD, que foi imunizado apenas uma vez. Os animais foram inicialmente anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg de peso corporal) para a obtenção do sangue total, posteriormente foi coletado o soro para dosagem de IgG1 e IgG2a. Em seguida os camundongos foram eutanasiados com a utilização da câmara de dióxido de carbono. Após a eutanásia foi retirado o baço para a obtenção dos esplenócitos (Figura 20.). Os procedimentos foram realizados de acordo com os procedimentos aceitos pelo Comitê de Ética em Uso Animal pela Universidade de Brasília (CEUA/UnB nº 45/2017).

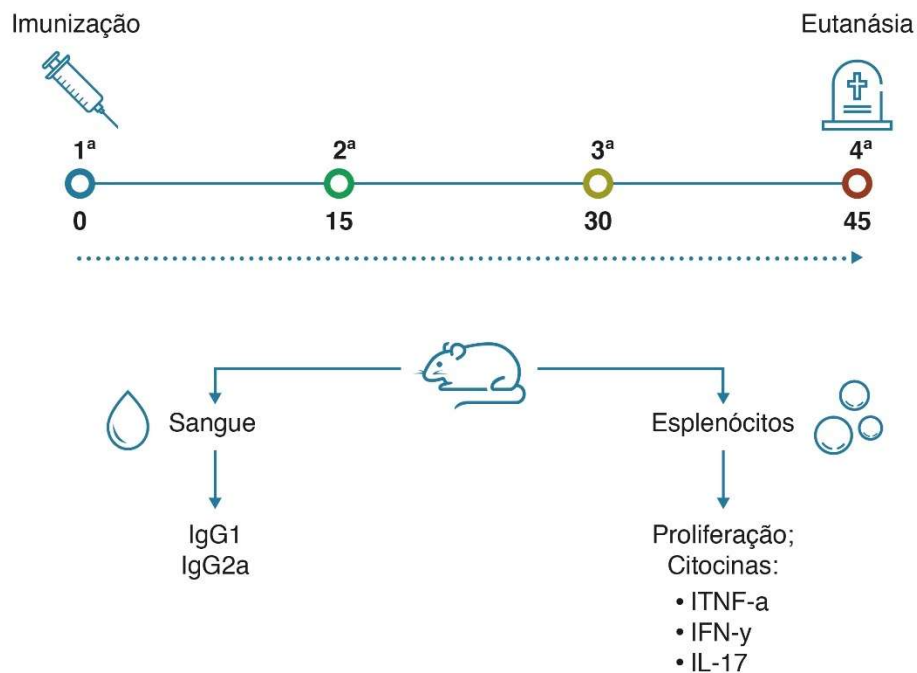


Figura 20. Esquema representativo de imunização de camundongos BALB/c inoculados com uma suspensão de poliedro ou veículo apenas. A imunização foi repetida a cada 15 dias, por 3 vezes. Após 15 dias, posterior a última imunização, realizou-se a eutanásia, com excessão do grupo vacinado que foi imunizado apenas uma vez. Coletou-se o sangue e os baços dos camundongos para os experimentos *in vitro* para avaliação da proliferação dos esplenócitos e dosagem de citocinas.

4.8. Teste de proliferação de esplenócitos

Após a eutanásia dos camundongos BALB/c, os baços, foram retirados para a obtenção dos esplenócitos. Para isso, os baços foram diluídos em meio RPMI-1640 e as suspensões celulares passadas através de peneira (cells trainer) de 70 μm para posterior lavagem por centrifugação (300 x g por 5 minutos). O sedimento celular foi ressuspenso em tampão de lise de eritrócitos (0.16 M NH_4Cl e 0.17 M Tris-HCl , pH 7.5) e novamente lavado para posterior incubação em estufa a 37°C e 5% de CO_2 em placa de petri, com volume final de 6 mL de RPMI. Após duas horas de incubação, as células não aderentes (população de células enriquecidas com linfócitos T), foram coletadas, ressuspenso em meio RPMI-1640 suplementado (1% de aminoácidos não essenciais; 1% de piruvato de sódio a 100 mM; 10% de Soro Fetal Bovino (SFB); 2 mM de L-glutamina; 50 μM de 2 β -mercaptoetanol; 50 mg/L de gentamicina) e contadas em hemocítmetro. Para a cocultura, os esplenócitos foram marcados com Carboxifluoresceínasuccinimidil éster (CFSE) e adicionados à cultura.

A cultura de esplenócitos foi coletada e ressuspensa em 1mL de PBS com CFSE (10 μ M). Agitou-se por sete minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, para parar a marcação, adicionou-se igual volume de SBF puro gelado e completou-se o volume do tubo com meio suplementado gelado e incubou-se por 5 minutos em temperatura de 4 °C. Posteriormente, as células foram lavadas com RPMI suplementado e a contagem das células marcadas foi realizada em hemocítmetro. Após a obtenção da concentração de linfócitos marcados com CFSE, estes foram adicionados à placa de 96 poços, para as culturas de proliferação celular. Cujos cada poço possuía 1x10⁵ esplenócitos no volume final de 200 μ L de meio RPMI suplementado.

Os esplenócitos foram estimulados com Concanavalina (4 μ g/mL), lipopolissacarídeo (500 ng/mL), 6xHisPolh (12,5 μ g/mL) e 6xHis-PolhEDIIIYF FA (12,5 ug/ml). As culturas, foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO² por 96 horas. Após incubação, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de citocinas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Os esplenócitos marcados com CFSE coletados, lavados e ressuspensos em 300 μ L de solução FACS. Posteriormente, um total de 50.000 eventos de cada amostra foram adquiridos no citômetro de fluxo, FACS Verse BD.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa FlowJo versão 8.7 para a determinação da porcentagem de células que sofreram divisão e para a representação gráfica dos resultados. Essa porcentagem é calculada por meio da mensuração da quantidade relativa de células que apresentaram decaimento da fluorescência do CFSE (em comparação ao grupo controle negativo), que ocorre quando da ativação e expansão clonal dos esplenócitos, visto que, como agente que se liga a proteínas intracelulares, o marcador tem seu sinal igualmente dividido durante a mitose celular. A tabulação dos resultados e construção dos gráficos foram feitas utilizando o programa GraphPadPrism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA).

4.9. Análise de concentração de Ig1 e Ig2a

Os níveis de IgG1 e IgG2 do soro de camundongos imunizados foram determinados por ELISA sanduíche de acordo com o fabricante (AFFYMETRIX, INC). Resumidamente, placas de 96 poços receberam o anticorpo (anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo), bloqueadas com tampão contendo soro albumina e incubadas com soro de camundongos imunizados. Após 12 h de incubação a 4°C, as placas foram lavadas com o tampão e adicionado anticorpo anti camundongo conjugado biotinizado conforme instruções do fabricante. A placa foi incubada

durante 3 h à temperatura ambiente, lavada e incubada com solução de substrato durante 15 min à temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa utilizando filtro de 450 nm. Os resultados foram expressos como ng/ml de proteína comparando densidades ópticas (DO) com uma curva padrão.

4.10. Análise dos níveis de citocina

A produção de citocinas foi medida a partir do sobrenadante *in vitro* de cultura de esplenócitos obtido de grupos imunizados por ELISA tipo sanduiche de acordo com o fabricante (BD Bioscience) comparados com uma curva padrão e expresso em pg/mL. (Não houve avaliação de amostras de soro porque a quantidade obtida não foi suficiente para dosar todas as citocinas, sendo então feito apenas os anticorpos). As leituras das densidades ópticas foram feitas a 450 nm no leitor de ELISA (espectrofotômetro de placas).

Para avaliação da expressão gênica níveis absolutos de TNF- α , IFN- γ e IL-17 foram calculados por PCR em tempo real e os níveis dos transcritos (fold change) foram determinados comparados com um gene constitutivo murino.

5. RESULTADOS

5.1. Confirmação da expressão de 6xHis-Polh e 6xHis-PolhEDIIIYF usando BEVS

Após a produção dos vírus recombinantes vAc6xHis-Polh e vAc6xHisPolh-EDIIIYF (utilizando o sistema Bac-to-Bac®), contendo o gene da poliedrina do AcMNPV com cauda de histidina 6xHisPolh (Figura 21A) e contendo o gene do domínio III da proteína de envelope do vírus FA fusionado a proteína poliedrina do vírus AcMNPV, 6xHisPolh-EDIIIYF (Figura 21B) respectivamente, as células de inseto Tn5B foram infectadas a MOI 1 e após 72 h. p. i. as células foram recolhidas e centrifugadas e o sedimento foi submetido a análise de imunomarcacão (*Western blot*). Detectamos a presença das proteínas recombinantes 6xHis-Polh (29,89 kDa), 6xHisPolh-EDIIIYF (41,025 kDA) nas células infectadas com a vAc6xHis-Polh (Figura 21C, linha 3), e vAc6xHisPolh- EDIIIYF (Figura 21C, linha 4). Estes resultados mostraram que os baculovírus recombinantes estavam expressando as proteínas de interesse com o tamanho esperado.

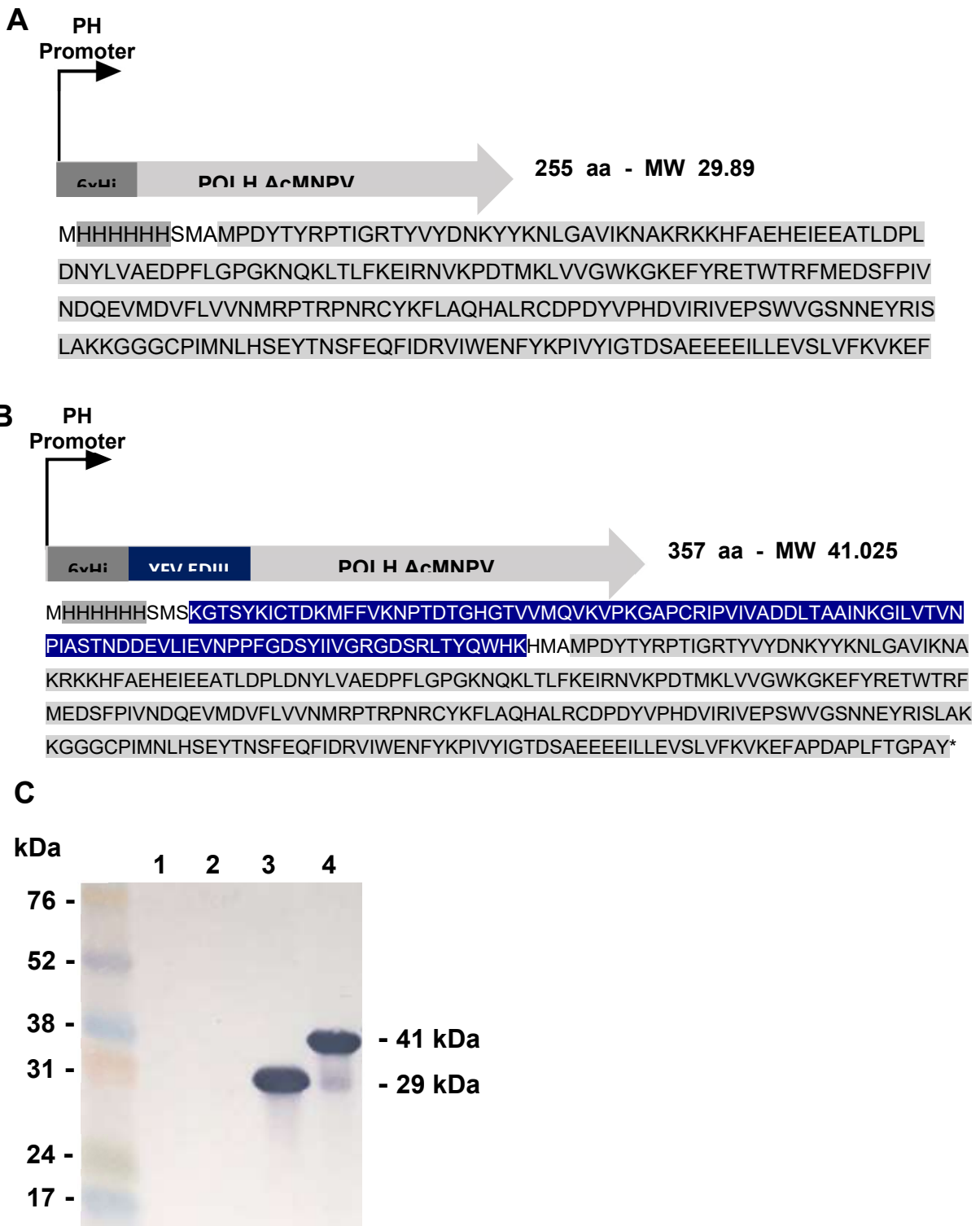


Figura 21. Esquema representativo da confirmação do plasmídeo v6xHisPolh-EDIIIYF. Em **A**, temos o plasmídeo pFASTamino que contém cauda de 6 histidinas e o gene da poliedrina (*polh*) sob o promotor *polh*. Em **B**, temos a cauda de 6 histidinas, o gene EDIIIYF fusionado ao *polh* do plasmídeo pFASTamino sob o promotor *polh*. Em **C**, Confirmação da expressão das proteínas recombinantes por *Western blot*. O extrato total de células Tn5B infectadas com o vírus recombinante vAc6xHisPolh-EDIIIYF após 72 h.p.i foi incubado com anti-soro monoclonal de camundongo anti-his. **M**) Marcador de massa molecular Prestained Protein Ladder (Promega). **1**) células Sf9 controle; **2**) vírus AcMNPV selvagem; **3**) v6xHis-Polh; **4**) vAc6xHisPolh-EDIIIYF.

5.2. Análise estrutural e ultraestrutural de células infectadas e corpos de oclusão

Após a confirmação da expressão das proteínas recombinantes, as células de inseto Tn5B foram infectadas a MOI 1 e após 72 h p. i. as células foram analisadas por microscopia de luz. Comparando com as células de insetos (Tn5B não infectadas) pode-se observar o efeito citopático (células arredondadas e maiores com núcleo hipertrofiado) em células infectadas com AcMNPV, vAc6xHisPolh e vAc6xHisPolh-EDIIIYF (Figura 22A). Os corpos de oclusão produzidos no núcleo de células infectadas com vAc6xHis-Polh (Figura 22A setas verdes) lembram os corpos de oclusão do AcMNPV selvagem (Figura 22A setas brancas). No entanto, quando as células foram infectadas com vAc6xHisPolh-EDIIIYF, observamos uma massa protéica no citoplasma das células (Figura 22A, setas vermelhas), fazendo com que as células parecessem maiores. Essa diferença na produção de corpos de oclusão pode ser causada pela interação poliedrina e EDIII. Para resolver esta questão, decidimos purificar estas proteínas recombinantes (6xHis-Polh e 6xHisPolh-EDIIIYF) de células infectadas nas mesmas condições e analisar os corpos de oclusão purificados sob microscopia eletrônica de varredura. Os corpos de oclusão purificados a partir de células infectadas pelo vAc6xHis-Polh mostraram a estrutura esperada (forma cúbica); por outro lado, os corpos de oclusão purificados produzidos pela infecção com o vAc6xHisPolh-EDIIIYF apresentaram um aspecto diferente, na forma de uma massa protéica (Figura 22B).

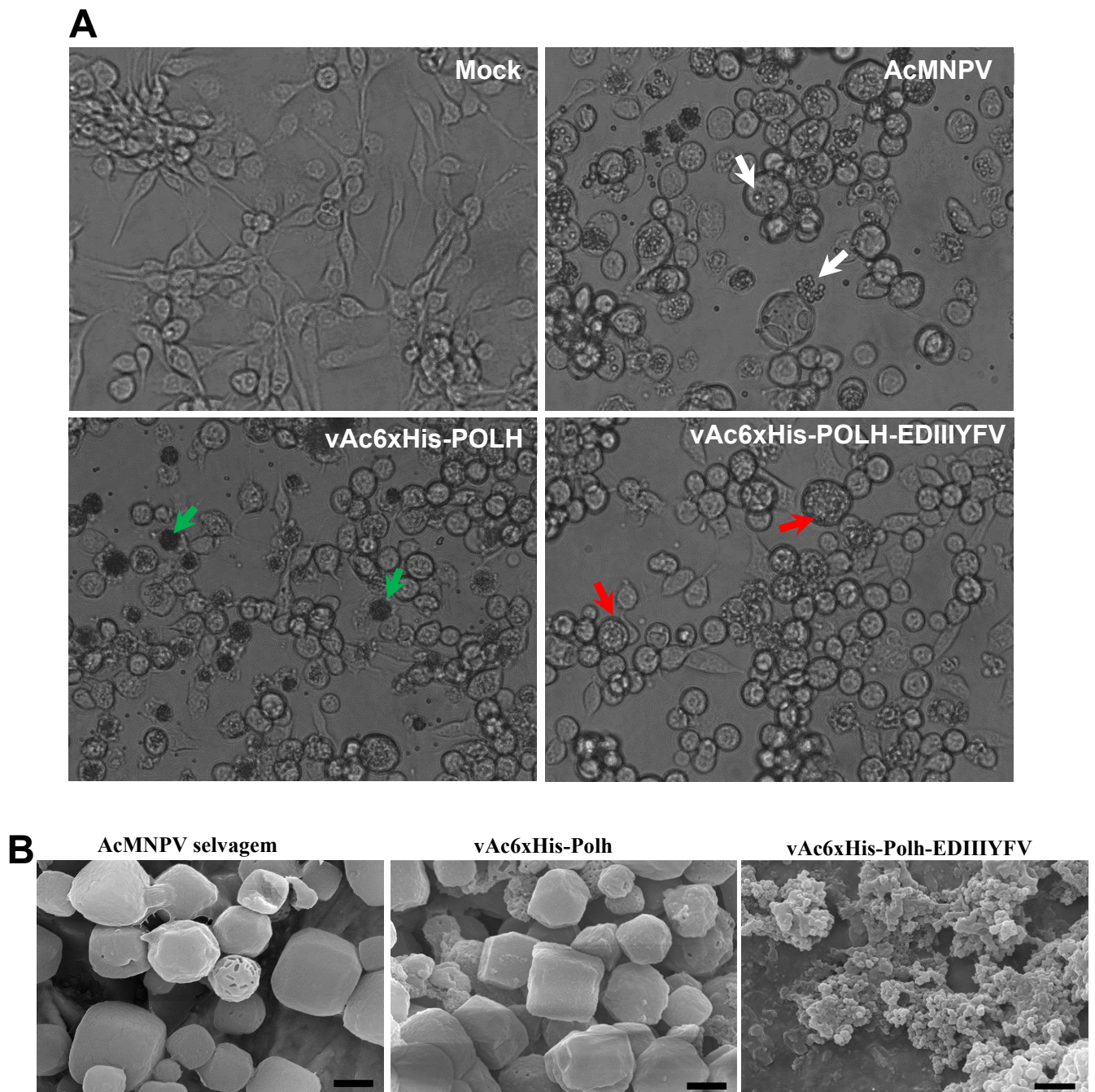


Figura 22. Análise da infecção do baculovírus recombinante v6xHisPolh-EDIIIYF por microscópio óptico (Axiovert 100, Zeiss) após 72 h.p.i - barra de referência – 20 μm . A figura A respectivamente, nos mostra células Sf9 controle não infectada; células infectadas com baculovírus selvagem AcMNPV apresentando poliedros típicos (setas brancas); células infectadas com o baculovírus vAc6xHis-Polh (setas verdes); e células infectadas com o baculovírus recombinante vAc6xHisPolh-EDIIIYF, mostrando a não formação de poliedros típicos e apresentando uma massa proteica proveniente da fusão de EDIII com a poliedrina (setas vermelhas). Em B, temos a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos recombinantes: poliedros de AcMNPV selvagem; poliedros do baculovírus vAc6xHis-Polh; e dos cristais do vAc6xHisPolh-EDIIIYF. Barra de referência - 1 μm .

5.3. Imunização dos camundongos e análise da proliferação dos esplenócitos

Para analisar o potencial imunogênico das proteínas recombinantes, foi realizada a imunização de camundongos BALB/c. Quatro tratamentos foram utilizados para imunizar os animais: PBS; 6xHis-Polh purificado; PolhEDIIIYF purificado; e vacina contra febre amarela 17DD. Após a imunização, os animais foram sacrificados, o baço coletado e os esplenócitos isolados. Para analisar a sensibilização específica do tratamento das células imunes dos camundongos, os esplenócitos foram tratados com diferentes estímulos (PBS; Con-A, LPS, 6xHis-Polh purificado e PolhEDIIIYF) e o teste de proliferação de esplenócitos realizado (Figura 23). A figura 23A mostra a avaliação da proliferação de esplenócitos de camundongos imunizados com PBS (controle). O resultado mostra que apenas os esplenócitos estimulados com ConA e LPS proliferaram significativamente (cerca de 60% e 49%, respectivamente). Esse resultado é esperado, pois o ConA é conhecido como mitógeno capaz de estimular a proliferação de células T. Também o LPS, um conhecido mitógeno de células B. Assim, o ConA e o LPS foram os controles positivos de proliferação do experimento.

As análises da proliferação de esplenócitos de animais imunizados com a vacina contra febre amarela 17DD (figura 23B) mostraram resultados interessantes. Houve uma proliferação evidente dos esplenócitos quando estimulados com o PolhEDIIIYF purificado (25%) em comparação com aqueles estimulados com 6xHis-Polh (5%).

No entanto, os resultados para o teste de proliferação de esplenócitos de animais imunizados com 6xHis-Polh ou PolhEDIIIYF purificado mostraram resultados semelhantes (Figura 23C e D). Porém para animais imunizados com 6xHis-Polh purificada (Figura 23C), a porcentagem de proliferação de esplenócitos foi de 24% para células estimuladas com 6xHis-Polh e 30% para células estimuladas com PolhEDIIIYF foi significativo. Para animais imunizados com PolhEDIIIYF purificado (Figura 23D) a porcentagem de proliferação de esplenócitos foi de 16% para células estimuladas com 6xHis-Polh e 22% para células estimuladas com PolhEDIIIYF, não apresentando significância.

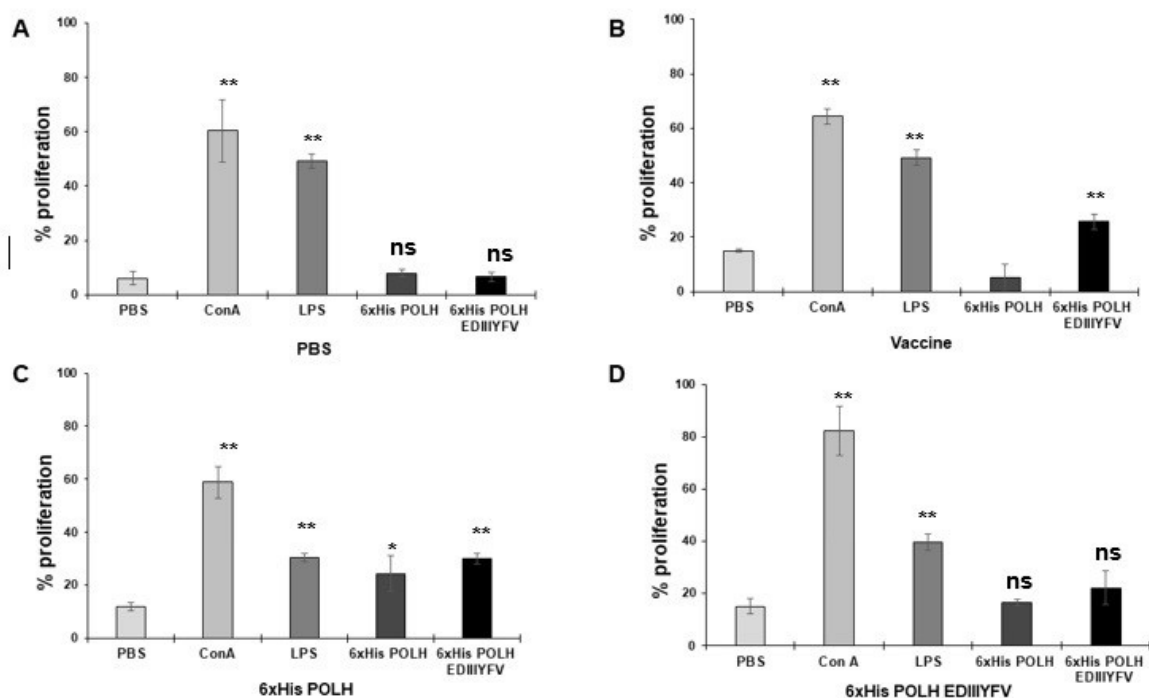


Figura 23. Análise da proliferação de esplenócitos testados com diferentes estímulos. Camundongos do tipo BALB/c (5 por grupo) foram imunizados por via subcutânea com PBS, vacina comercial contra FA (17DD), v6xHis-Polh e v6xHisPolh-EDIIYF apenas uma vez. Destes, foram extraídos esplenócitos que foram testados quanto à sua proliferação quando estimulados com PBS (A), Vacina (B), v6xHis-Polh (C) e v6xHisPolh-EDIIYF (D). Neste procedimento foi utilizado dois controles positivos, o LPS (estímulo positivo para linfócitos do tipo B) e a ConA (estímulo positivo para linfócitos do tipo T). Teste T de variação desigual (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0.01$; (ns) não significante.

5.4. Produção de IgG1 e IgG2a em camundongos imunizados

Para avaliar o tipo de resposta imune desencadeada pela imunização de camundongos com as proteínas 6xHis-Polh e PolhEDIIYF, foram realizadas as análises de produção de anticorpos IgG1 e IgG2a. A produção de IgG1 e IgG2a em camundongos é um indicativo respectivamente de respostas imunes Th2 e Th1. A figura 24A mostra níveis de produção semelhantes de IgG1 em grupos imunizados com vacina 17DD, 6xHis-Polh e PolhEDIIYF em comparação com o grupo controle. Porém, a produção de IgG1 nos grupos imunizados foi diferente em relação aos níveis de produção de IgG2a (Figura 24B). Os níveis de IgG2a nos grupos vacina 17DD, 6xHis-Polh e PolhEDIIYF foram muito semelhantes e consideravelmente maiores em comparação ao grupo controle.

5.5. Análise da resposta imune

A resposta imune desencadeada pela imunização dos camundongos com as proteínas 6xHis-Polh e PolhEDIIIYF foi avaliada por ensaio de secreção específica de citocinas. Os linfócitos coletados de camundongos imunizados com PBS, vacina 17DD (Vac), 6xHis-Polh e polhEDIIIYF foram incubados em meio RPMI (controle negativo), ConA (controle positivo), 6xHis-Polh e PolhEDIIIYF como estímulos. Após, os níveis de secreção de IL-17, IFN- γ e TNF- α foram avaliados.

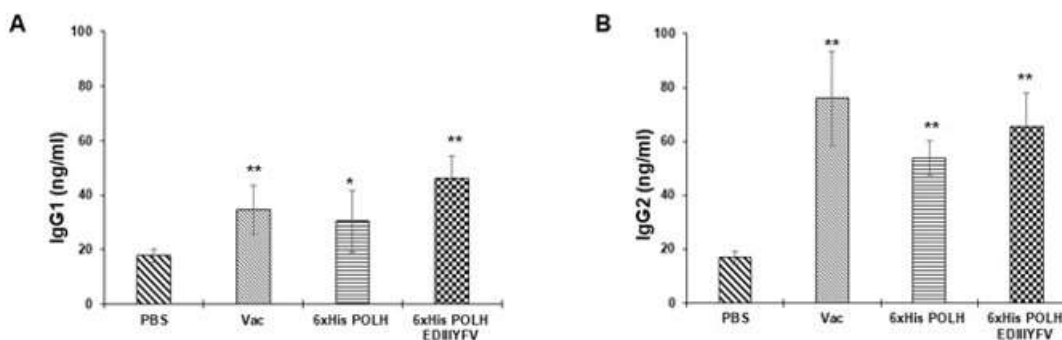


Figura 24. Análise da dosagem de IgG1 e IgG2a no soro dos camundongos imunizados, utilizamos o kit de dosagem de anticorpos Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) para IgG1 e IgG2a. Para este procedimento foi utilizado (anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo) nos 4 grupos testados: PBS, vacina comercial contra FA (17DD), v6xHis-Polh e v6xHisPolh-EDIIIYF. Teste T de variação desigual (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0.01$; (ns) não significativo.

A figura 25A mostra os níveis de secreção de IL-17 nos quatro grupos imunizados após estimulação. O experimento mostrou que as células de grupos imunizados com a vacina 17DD (Vac), 6xHis-Polh e PolhEDIIIYF induziram a secreção de IL-17 quando estimuladas com 6xHis-Polh e PolhEDIIIYF. A secreção de IL-17 está relacionada à resposta imune pró-inflamatória Th17.

O mesmo experimento foi realizado para analisar a produção de IFN- γ (Figura 25B). Neste experimento, podemos observar uma diferença significativa na produção de IFN- γ entre os grupos 6xHis-Polh e PolhEDIIIYF. Enquanto os níveis de IFN- γ foram quase nulos nas células de animais imunizados com 6xHis-Polh e estimulados com a mesma proteína, os níveis de produção de IFN- γ foram expressivos em células de animais imunizados com PolhEDIIIYF após todos os estímulos.

Por fim, foram avaliados os níveis de TNF- α como descrito acima na figura 26. Os resultados mostraram que os níveis de TNF- α foram elevados em animais imunizados com 6xHis-Polh e PolhEDIIIYF em quase todos os estímulos, mesmo em comparação com os níveis de TNF- α no grupo imunizado com a vacina.

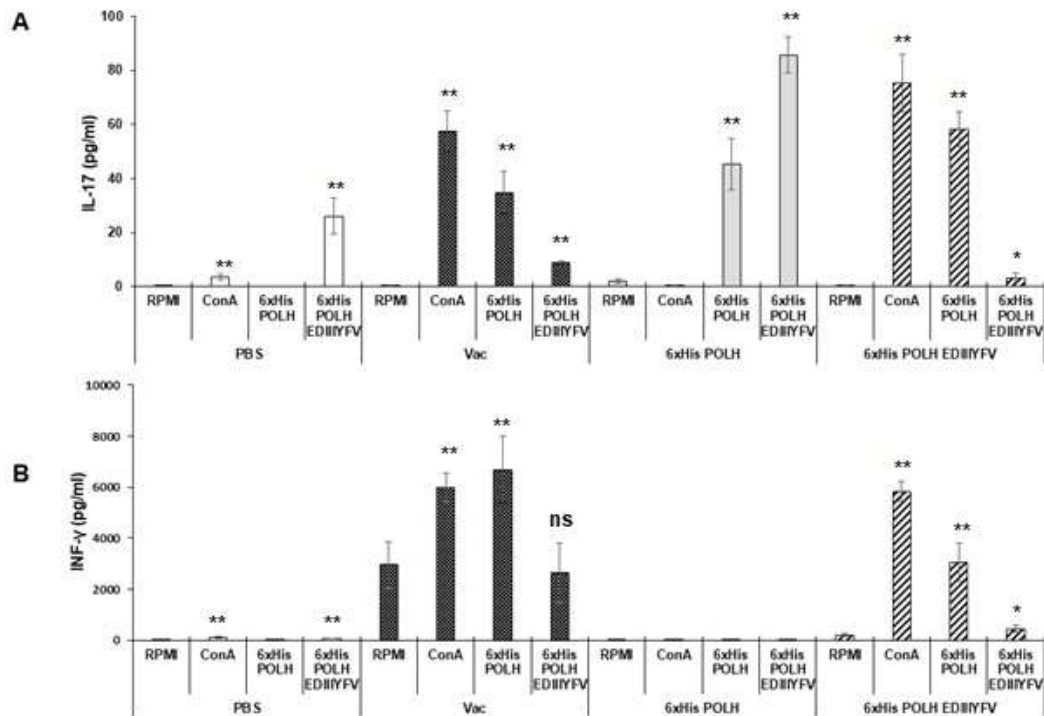


Figura 25. Análise da dosagem de IL-17, IFN- γ e TNF- α foi realizado no sobrenadante do experimento in vitro através de ELISA indireto. Para este procedimento foi utilizado (anti-IL-17 de camundongo) em (A) e (anti- IFN- γ de camundongo) em (B). Os 4 grupos imunizados com PBS, vacina comercial contra FA (17DD), v6xHis-Polh e v6xHisPolh-EDIIIFV receberam o controle positivo, a ConA (estímulo positivo para linfócitos do tipo T). Teste T de variação desigual (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (ns) não significante.

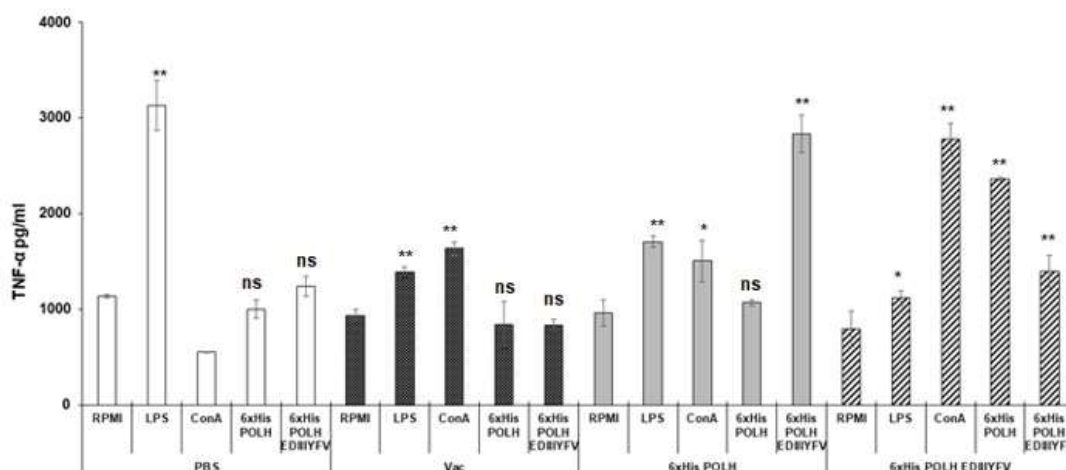


Figura 26. Análise da dosagem de TNF- α . Neste experimento foi utilizado (anti- TNF- α de camundongo), dois controles positivos, o LPS (estímulo positivo para linfócitos do tipo B) e a ConA (estímulo positivo para linfócitos do tipo T). Teste T de variação desigual (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (ns) não significante.

6. DISCUSSÃO

A vacinação é uma medida preventiva importante destinada a estabelecer defesas imunitárias específicas (anticorpos ou imunidade celular) para proteger os indivíduos de doenças infecciosas. Na maioria das vacinas convencionais, os organismos mortos ou atenuados atuam como uma fonte de imunógenos (Shams, 2005).

A primeira geração de vacinas foi baseada em patógenos atenuados ou inativados. Estas vacinas baseadas em patógenos completos mostraram-se extremamente eficazes e, em alguns casos, como na doença da varíola, levaram à completa erradicação do patógeno alvo. No entanto, existem preocupações sérias associadas ao uso de patógenos completos para a imunização, uma vez que se verificou que eles induzem efeitos colaterais severos com alguma frequência nas populações (Plotkin *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2017).

Outro exemplo de uma vacina com vírus atenuado que está no mercado há muitos anos é a vacina contra a febre amarela, YF-17D. No Brasil, a cepa YF-17DD da vacina, é capaz de induzir uma resposta imune protetora de longo prazo com a administração de uma única dose. Esta dose é capaz de ativar o sistema imunológico através da estimulação de células citotóxicas auxiliares, Th1 e Th2; além de induzir a produção de anticorpos neutralizantes. Assim, a vacinação contra FA é eficiente em ativar a resposta imune celular e humoral, conferindo proteção por mais de 30 anos (Monath, 2005).

Pode-se observar que a resposta imune é significativa dentro do esperado para uma vacina, entretanto, apresenta limitações que devem ser consideradas, como o aumento de relatos de efeitos adversos na população, dentre eles, respostas alérgicas ou de hipersensibilidade após a vacinação. Mas o fato que consideramos de grande relevância é que a vacina disponível não é recomendada para pessoas com imunodeficiência, já que há riscos de reversão de virulência em um hospedeiro com depressão do sistema imunológico (Vasconcelos, 2003), indivíduos acima de 60 anos de idade e mulheres grávidas ou amamentando. Além disso, como o vírus é cultivado em embriões de galinha, a vacina pode conter proteínas do ovo, que pode ser prejudicial para pessoas com hipersensibilidade á essas proteínas (Chernin; Swender; Hostoffer, 2011).

Sabe-se que quanto maior a cobertura vacinal de uma vacina, menores são os riscos de epidemias. Recentemente, houve reincidência da doença no Brasil entre 2016 e 2018, com mais de 2.000 casos confirmados, incluindo 500 óbitos. Os pesquisadores acreditam que este surto começou no Nordeste e migrou para o Sul, onde nunca havia sido relatado casos até o momento (Barret, 2018). Esses dados reafirmam a necessidade de manter os esforços para produzir um novo tipo de vacina, que pode atingir um número maior de pessoas. Além disso, uma vacina de nova geração pode reduzir o custo, o tempo e a necessidade de requisitos especiais durante o armazenamento e a distribuição (Demento *et al.*, 2011).

As vacinas de subunidades são vacinas que usam peptídeos antigênicos específicos para desencadear uma resposta imune específica (Moyle; Toth, 2013). É sabido que as vacinas de subunidades são capazes de desencadear resposta imune forte e específica. Assim, as vacinas das subunidades são mais seguras, baratas e fáceis de produzir, em comparação com as vacinas tradicionais (atenuadas e/ou inativadas) (Skwarczynski; Toth, 2014; Foged, 2011). Como mencionado acima, a vacina da FA disponível contém várias limitações e uma vacina alternativa (subunidade) poderia resolver esses problemas.

O sistema BEVS utilizado neste trabalho é caracterizado e extensivamente utilizado para a produção de proteínas durante a infecção de larvas de lepidópteros ou cultura estabelecida de células de inseto (O'Reilly; Miller; Luckow, 1992). Além disso, é capaz de incorporar uma proteína heteróloga no corpo da oclusão, fundindo o gene de interesse ao gene *polh*, além de manter o gene *polh* selvagem (Je *et al.*, 2003; Ardisson *et al.*, 2013). Esta característica leva-nos a crer que este sistema é uma alternativa para a produção de antígenos de diferentes patógenos para fins de vacinação, tanto para humanos como para animais e como estudos em modelo murino apontam que a proteína EDIII, é o principal alvo de anticorpos neutralizantes e

que esta apresenta epítomos responsáveis por interagir com receptores na superfície das células alvo, mediando a endocitose da partícula viral (Modis *et al.*, 2005). Devido a estas propriedades, a expressão de EDIII foi estudada como uma possível candidata para uma vacina de subunidade para vários flavivírus. A resposta de anticorpos induzida pela imunização de camundongos pelo EDIII do vírus da encefalite japonesa (JEV), foi capaz de proteger os animais em um ensaio de desafio letal (Fan *et al.*, 2013). Camundongos imunizados com EDIII - DENV foram capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes com apenas duas imunizações para gerar resposta de memória imune contra infecção por DENV, e sem a presença de adjuvante (Coconi-Linares *et al.*, 2013).

Algumas proteínas heterólogas de diferentes vírus foram expressas usando este sistema (Je *et al.*, 2003; Ardisson-Araújo *et al.*, 2013), consolidando a técnica como uma ferramenta biotecnológica para a produção de vacinas de subunidade. Além disso, o sistema de expressão de baculovírus em células de insetos fornece um ambiente adequado para a síntese de proteínas eucarióticas, fornecendo condições para dobramento adequado da estrutura da proteína, formação de pontes dissulfeto, oligomerização e modificações pós-traducionais similares àquelas produzidas em células de mamíferos (O Reilly; Miller; Luckow, 1992). Embora a cultura bacteriana seja mais econômica do que as células de insetos, o custo do processo de purificação das proteínas expressas em bactérias é frequentemente alto, tornando vantajosa a expressão em células de insetos (Montor; Sogayar, 2003). Ainda, pode se destacar a facilidade de purificação destas proteínas recombinantes que, na maioria dos casos, formam um corpo de oclusão facilmente separado por centrifugação em um gradiente de sacarose.

Com base nisso, analisamos o tipo de resposta imune desencadeada pela imunização de camundongos com as proteínas recombinantes 6xHis-POLH e 6xHis-POLH-EDIIIFA. Este trabalho foi o primeiro a testar o EDIII de FA fusionado a proteína (POLH) do AcMNPV como um imunogênio em camundongos. A fusão entre EDIII e POLH gerou uma massa protéica uniforme, diferentemente do formato poliédrico conhecido encontrado nos OB do AcMNPV selvagem. Provavelmente, esse formato é devido aos aminoácidos extras presentes no poliedrina recombinante, que alteraram a dobragem final da proteína. Apesar disso, a massa proteica gerada neste trabalho foi eficientemente expressa e facilmente coletada das células que expressam. Durante os experimentos, percebemos que não havia necessidade de purificação por gradiente de sacarose, principalmente devido à diferença de formato e consistência dos corpos de oclusão gerados, apenas lavagens com detergente foram realizadas e a purificação foi satisfatória, como demonstrado nos experimentos de microscopia.

Após a expressão, as proteínas recombinantes foram utilizadas para imunizar camundongos e a resposta imune avaliada. Os resultados encontrados neste trabalho revelam níveis semelhantes de proliferação linfocitária nos camundongos imunizados com o 6xHis-POLH e 6xHis-POLH-EDIIIYFV sob diferentes estímulos. Acreditamos que esse resultado se deve à indução da resposta imune mediada pela proteína poliedrina. A inoculação intra-nasal de recombinantes de baculovírus em camundongos desencadeou uma resposta imune inflamatória *in vivo*; e *in vitro* eles foram capazes de aumentar a resposta das células Th1, mostrando um potencial para serem usados como adjuvante em possíveis candidatos a vacinas (Zhang *et al.*, 2018). Um resultado interessante é mostrado na figura 25, onde podemos observar claramente que os linfócitos de camundongos imunizados com a vacina da FA (cepa 17DD) estão respondendo aos estímulos 6xHis-POLH-EDIIIFA. Este resultado confirma o reconhecimento do epítipo EDIII no recombinante. Além disso, a figura 24 revelou um título mais alto de IgG2 em comparação com o anticorpo IgG1 no soro de animais imunizados com a vacina, 6xHis-POLH e 6xHis-POLH e 6xHis-POLH-EDIIIYFV. Este resultado pode ser um indicativo da produção de uma resposta imune específica. Corroborando nossos resultados, os níveis de produção de IL-17, INF- γ e TNF- α sob diferentes estímulos para caracterizar o tipo de resposta imune induzida pelo baculovírus recombinante. Baseado nesses dados, consideramos que nossa estratégia de apresentar o EDIII fusionado a POLH de baculovírus, como antígeno, foi capaz de desencadear uma resposta imune Th1/Th17. Nossas descobertas são semelhantes a um estudo que avaliou o tipo de resposta imune desencadeada por camundongos imunizados com o EDII da proteína do vírus do Nilo, (WNV) expressa em plantas. Os resultados do estudo mostraram que a imunização foi capaz de desencadear respostas de IgG1 e IgG2a em camundongos, e outros experimentos indicaram a ativação de respostas imunes do tipo Th2 e Th1 (He *et al.*, 2014). Além disso, a proteína expressa em plantas foi capaz de proteger os ratos contra a infecção letal por WNV (Lai *et al.*, 2018). Com base nisso, a resposta imune desencadeada pela imunização com os recombinantes fornece evidências de uma ativação específica do sistema imunológico.

O estudo de Khan e colaboradores (2019) demonstrou que a proteína EDIII de DENV induz resposta pró-inflamatória e conseqüentemente produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α nas células de monócitos humana (THP-1), revelando o papel da proteína EDIII de DENV na modulação de respostas inflamatórias inatas, o que pode fornecer possível

mecanismo de patogênese e abrir novos caminhos para o desenvolvimento terapêutico contra DENV.

Neste sentido entendemos que essa estratégia foi eficiente para induzir uma resposta imune contra a proteína recombinante, experimentos adicionais devem ser realizados para determinar a eficiência do método para a produção de uma vacina de FA alternativa. Nossos dados sugerem que esse sistema tem potencial para ser uma plataforma de desenvolvimento de vacinas de subunidades que pode ser melhorada e estendida no futuro.

Capítulo III

Expressão de proteínas NS1 recombinantes de flavivírus em células de inseto e seu uso como insumos para diagnóstico

1. Arboviroses emergentes - Dengue e Zika

Os arbovírus são responsáveis por uma das doenças emergentes mais infecciosas do mundo, os surtos são imprevisíveis e de grande potencial abrangente, podendo resultar em epidemias que ameaçam a saúde pública global (Fauci; Morens, 2012; Wilder-Smith; Byass, 2016). Destacamos neste contexto o vírus da dengue (DENV) como o precursor, com 400 milhões de casos registrados em todo o mundo, e recentemente o aparecimento do vírus Zika (ZIKV) que está fortemente associado a síndrome de Guillain-Barré e a microcefalia em recém-nascidos. Ambos vírus são transmitidos aos seres humanos pela picada das fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor da doença nas Américas (Panwar; Singh, 2018). *A. aegypti* é um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar os seus ovos. Estes têm uma alta capacidade de resistir à dessecação, mantendo-se viáveis na ausência de água por até 450 dias (Tauil, 2002).

Estudos demonstram que para ocorrer a transmissão no caso do vírus da dengue é necessário que o título viral seja de pelo menos 10^9 cópias de RNA viral/mL de sangue (Nguyen *et al.*, 2013). Estudos filogenéticos mostraram que os seres humanos contraíram o vírus da dengue de primatas não-humanos, em um processo de transmissão cruzada que provavelmente deve ter sido ocasionado pelo mosquito *Aedes albopictus* que após picar o macaco infectado, transmitiu para populações de zonas rurais e estes por sua vez para o perímetro urbano (Gluber, 1998).

Uma vez infectados, pacientes apresentam manifestações clínicas semelhantes nos estágios iniciais, que incluem febre, dor de cabeça, artralgia, mialgia e exantema maculopapular, um complexo de sintomas que dificultam o diagnóstico (Carrillo-Hernandez *et al.*, 2018). No entanto, a infecção pelo DENV é majoritariamente assintomática, porém, quando sintomática, pode resultar em um amplo espectro de manifestações clínicas as quais variam de acordo com as características do indivíduo e do vírus como: cepa e sorotipo viral, idade, etnia,

estado imunológico, fatores genéticos e comorbidades (Ross, 2010; Nedjadi *et al.*, 2015; Unnikrishnan *et al.*, 2015).

Estas manifestações clínicas são classificadas de acordo com a intensidade da doença que varia da forma mais branda, como a dengue clássica (DC), até formas mais graves como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque da dengue (SCD) (Gubler, 2006). Em 2009, estas manifestações clínicas sofreram reclassificação como: dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta e dengue grave. Nesse novo critério, os sinais de alerta são determinados como: dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de fluido (ascite ou efusão pleural), sangramento de mucosas, letargia e hepatomegalia, além de trombocitopenia exacerbada (Who, 2018).

Segundo Hosrtick *et al.* (2015) um dos principais motivos desta mudança é a facilidade na definição correta dos casos de dengue para estudos clínicos, porque define mais precisamente a gravidade da doença e permite avaliar de forma dinâmica a progressão dos casos e ajuda na reorganização dos serviços de saúde para a gestão de surtos.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência da dengue mundialmente aumentou cerca de 30 vezes nos últimos 50 anos. A primeira evidência de surto da dengue com diagnóstico laboratorial foi registrada em 1981 no estado de Roraima com os sorotipos 1 e 4 do DENV, mas este surto foi rapidamente controlado (Osanai *et al.*, 1983). O DENV possui quatro sorotipos que são geneticamente e antigenicamente distintos (DENV 1,- 2,- 3 e 4) (Who, 2015), os quais originaram-se em macacos e foram transmitidos independentemente para os seres humanos na África ou no Sudeste da Ásia entre 100 e 800 anos atrás (Horstick *et al.*, 2015). O DENV-1 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro em 1986, se espalhando pelo país (Schatzmayr *et al.*, 1986). Em 1990, DENV-2 também foi introduzido no Rio de Janeiro, sendo responsável, junto com DENV-1, pelo aparecimento das primeiras manifestações das formas graves da doença (Nogueira *et al.*, 1990). O DENV-3 foi introduzido no Brasil em 2002, sendo responsável por grandes epidemias que se disseminaram por todo o país nos anos seguintes (Nogueira *et al.*, 2005). Em 2010, o sorotipo 4 reapareceu na região Norte do país com casos notificados da doença nos estados de Roraima e Amazonas (Nogueira; Spinghauss, 2011).

E em 2013, foi constatado um novo sorotipo, o DENV-5. Os estudos indicam que esse novo sorotipo é geneticamente similar ao sorotipo 2 e causa uma reação moderada da doença. Mediante métodos moleculares, pode-se destacar a classificação de cada sorotipo em genótipos distintos de I a V, baseados no genoma completo ou parcial destes vírus (Mustafa *et al.*, 2015).

Mas desde então, apenas os 4 sorotipos co-circulam no Brasil e o DENV-2 foi o sorotipo mais prevalente em vários surtos nas Américas e foi classificado epidemiologicamente como o sorotipo mais relevante em todo o mundo devido à sua associação com o maior número de surtos intensos, seguidos em sequência por DENV-3, DENV-1 e DENV-4 (Fares *et al.*, 2015). Essas epidemias recorrentes causadas por diferentes sorotipos virais contribuíram para uma mudança no perfil epidemiológico da dengue no Brasil. Nos anos de 2007 e 2008, verificou-se um deslocamento de faixa etária acometida pela dengue grave com um súbito aumento da incidência das formas mais graves entre indivíduos menores de quinze anos (Teixeira; Barreto, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011). Este cenário pode ser explicado pelo fato dos indivíduos de mais idade adquirirem imunidade contra os sorotipos circulantes enquanto os indivíduos mais jovens, que ainda não entraram em contato com o vírus, ficam mais susceptíveis à infecção (Teixeira; Barreto, 2009, Coelho *et al.*, 2008; Rodriguez-Barraquer *et al.*, 2011; Buratinni *et al.*, 2016).

Atualmente, a doença é endêmica em mais de 100 países e cerca de 3,9 bilhões de pessoas no mundo vivem em área de risco de infecção (Who, 2016). Estima-se que 390 milhões de pessoas sejam infectadas pelo vírus da dengue todos os anos, com 96 milhões de casos de manifestação da doença e 20 mil óbitos (Bhatt *et al.*, 2013). De 1998 a 2018 mais de 20 milhões de casos foram contabilizados nas Américas, sendo 65% destes casos reportados no Brasil (Who, 2019). A Global Strategy for Dengue Prevention and Control, da WHO (2012–2020) estabeleceu prioridades de pesquisa para o desenvolvimento de estratégias para inverter a tendência epidemiológica da dengue. As três metas principais são: reduzir a mortalidade em 50% até 2020, reduzir a morbidade em 25% até 2020 e manter o foco nos esforços em todas as áreas de pesquisas de controle, prevenção e tratamento da doença (Who, 2012)

Acredita-se que outros fatores como o crescimento da população mundial associado à urbanização das cidades, realizada muitas vezes sem prévio planejamento e/ou controle, contribui para a decadência da infraestrutura na saúde pública em diversas regiões, criando condições ideais para o aumento da ocorrência de doenças transmitidas por mosquitos (Who, 2017). Ainda, a falta de controle efetivo do mosquito transmissor *A. aegypti* em áreas endêmicas, especialmente em centros urbanos de regiões tropicais, propicia o aumento de ambiente adequado para o desenvolvimento de suas larvas em ambientes domésticos, e, por fim o aumento da mobilidade humana, principalmente em viagens aéreas, possibilita o mecanismo ideal para o transporte do vetor transmissor da Dengue (Gubler, 1998; Rigau-Perez *et al.*, 1998). Segundo Murphy e Nathanson (1994), os fatores de maior importância para a expansão e o aumento das epidemias de dengue estão relacionados com modificações na ecologia humana,

as quais propiciam um maior contato com o *A. Aegypti*, além do aumento considerável das mutações e evoluções dos próprios vírus, contribuindo com a ampliação da patogenicidade ou alterações antigênicas incididas por um determinado vírus que o possibilitam infectar populações já imunes a cepas progenitoras do mesmo vírus.

No Brasil, o último boletim epidemiológico disponibilizado pelo Ministério da Saúde (MS) do ano de 2019, de dezembro/2018 até março/2019, foram registrados 229.064 casos prováveis no país, onde a maior incidência foi na região Sudeste com 149.804 casos; 65,4% em relação ao total do país (Brasil, 2019).

O drástico alastramento da dengue nas últimas décadas representa um problema de saúde pública mundial, sobretudo devido às dificuldades enfrentadas no controle de epidemias recorrentes e o aumento do número de casos graves da doença. Desta forma, é de suma importância a busca por estratégias preventivas que abarquem o controle vetorial e o desenvolvimento de vacinas protetoras (Rather *et al.*, 2017).

Desde os anos 1980, o tema da dengue é frequentemente encontrado nos boletins epidemiológicos a cada emergência sazonal da doença, normalmente a cada ano. Dada a presente situação envolvendo o ZIKV, o cenário se volta para essa nova preocupação na área da saúde pública (Valle; Pimenta; Aguiar, 2016).

O ZIKV foi praticamente negligenciado até sua introdução na América em 2015 e sua subsequente difusão ao longo desse continente, onde milhares de pessoas foram infectadas. A sua alta velocidade de propagação, bem como, a gravidade das possíveis implicações da doença tem provocado enorme interesse público e científico (Huang *et al.*, 2013; Saiz *et al.*, 2016).

Este vírus foi isolado em 1947 de um macaco *Rhesus* sentinela, na floresta Zika, em Uganda. Foi encontrado em humanos em 1952, e, em 1964, foi finalmente relacionado à doença Zika. Em 2007, foi reportado um grande surto na Micronésia, onde uma “doença tipo dengue” infectou mais de 70% da população do Estado Yap. Outro surto ocorreu em 2013 na Polinésia Francesa e, subsequentemente, em outras ilhas do Pacífico (Fauci; Morens, 2016; Kindhauser *et al.*, 2016).

Em novembro de 2015, o MS decretou epidemia do ZIKV, emergência na saúde pública de importância nacional. Em fevereiro de 2016, a OMS decretou emergência de saúde pública de interesse internacional. Até agora, o maior surto mundial desse vírus ocorreu no Brasil, com 211.770 casos confirmados até dezembro de 2016 (Kindhauser *et al.*, 2016; Brasil, 2018).

Após o surto no Brasil, o vírus se espalhou rapidamente entre o continente americano, causando um grande aumento no número de infecções por ZIKV em países da América Latina

e Central (Lessler *et al.*, 2016). O surto infeccioso registrado na Colômbia mostrou, assim como no Brasil, um aumento muito grande nos casos relatados de microcefalia e síndromes neurológicas graves sustentando a hipótese de uma correlação entre as patologias (Pacheco *et al.*, 2016; Rica; Lucia, 2016).

A síndrome de *Guillain-Barré* pode ser uma desordem neurológica devastadora, pois representa ameaça de paralisia e até morte (Mlakar *et al.*, 2016; Stagg; Hurst, 2016). Nessa doença as células do sistema imune passam a atacar células do sistema nervoso central resultando em deficiências no desenvolvimento sensomotor do paciente (Rabaan *et al.*, 2016). Existem diversos fatores genéticos e ambientais associados a essa condição, tais como, desnutrição severa; exposição a substâncias tóxicas; injúria cerebral traumática, infecção, e, exposição a doenças, como rubéola, toxoplasmose, citomegalovirose e, agora, zika (Stagg; Hurst, 2016).

Um estudo realizado na Polinésia Francesa entre novembro de 2013 e fevereiro de 2014 por Cao-Lormeau e colaboradores, (2016) demonstrou que todos os 42 pacientes diagnosticados com a síndrome apresentavam anticorpos neutralizantes contra ZIKV. Além disso, 93% dos pacientes apresentavam IgM contra ZIKV, bem como 88% dos pacientes relataram sintomas semelhantes a Zika num período de 6 dias antes do aparecimento dos sintomas neurológicos característicos de *Guillain-Barré*. Dessa maneira, os autores sugeriram que os pacientes tiveram uma infecção recente por ZIKV e, portanto, a incidência dessa síndrome pode estar relacionada a infecção por este vírus.

Em resumo, a entrada e replicação de ZIKV, em conjunto, ativam vias de sinalização, que subsequentemente ativam fatores de transcrição. Esses fatores de transcrição causam a desregulação da transcrição da célula hospedeira, levando às respostas antivirais e pró-inflamatórias. Assim, o ZIKV ativa complexos protéicos que são funcionalmente associados com processos da doença, tais como, ativação e proliferação das células da glia, apoptose e morte celular, e inflamação. A ativação desses complexos, portanto, pode contribuir criticamente para manifestação da doença zika (Theel; Hata, 2018).

Essa associação já foi apoiada por vários casos relatados, uma vez que em alguns deles a infecção por ZIKV foi confirmada em laboratório em amostras de tecido fetal, placenta, líquido amniótico no caso de gravidez interrompida e no cérebro de fetos com microcefalia (Mlakar *et al.*, 2016). Contudo, não se tem conhecimento das sequelas a longo prazo desencadeadas por esta malformação (Barzon *et al.*, 2016).

Ao contrário de muitas flaviviroses, existe forte evidência de que o ZIKV pode ser transmitido, também, de humano para humano, através de muitas rotas diferentes, incluindo contato sexual, transfusão sanguínea e, ainda, verticalmente, da mãe para o feto. As anormalidades congênitas associadas com ZIKV indicam que eles são capazes de atravessar a barreira placentária, e evidências *in vitro* demonstram que ZIKV é capaz de infectar macrófagos e citotrofoblastos da placenta humana (Opas, 2018; Wang *et al.*, 2017).

Dados do MS estimam que, no auge da epidemia, casos de microcefalia chegaram a ter um aumento de, aproximadamente, 20 vezes, entre recém-nascidos na região nordeste do país. Esse fato foi um forte indicativo da associação entre a infecção ZIKV na gravidez e malformações fetais, como microcefalia (Brasil, 2018).

A microcefalia pode ser classificada como uma condição rara em que o perímetro cefálico de recém-nascidos afetados é notavelmente reduzido, o qual é resultado do desenvolvimento anormal do cérebro durante a gestação. Crianças com essa condição irão apresentar problemas como convulsões, deficiência intelectual, problemas de desenvolvimento, atraso nas funções motoras e de fala e deficiências visuais.

A prevenção da infecção maternal é a única maneira de prevenir a transmissão vertical, porque ainda não existem tratamentos antivirais ou vacinas contra ZIKV disponíveis no mercado. A chave para a produção de novos medicamentos antivirais para controle do vírus no útero requer um vasto entendimento da patofisiologia da replicação do vírus e os mecanismos moleculares envolvidos na transmissão transplacentária (Fuwa; Hayakawa, 2016).

Inúmeros estudos foram desenvolvidos no intuito de desenvolver uma plataforma de vacina que eficientemente levasse a proteção da população contra as infecções por ZIKV, contudo esse processo é bastante lento e burocrático, não existindo ainda um modelo acessível para a população (McArthur, 2017).

Segundo dados da OMS cinco candidatos de vacinas para ZIKV, desenvolvidos a partir de diferentes métodos experimentais, encontram-se na primeira fase de testes clínicos atualmente (GLS-5700, VRC ZIKV DNA, AGS-v, MV-ZIKA, Mrna-1325) e um candidato encontra-se na segunda fase de testes clínicos (VRC 705) (Who, 2017).

Segundo dados da OMS o número de infecções pelo vírus da Zika diminuiu significativamente nos anos de 2017 e 2018, contudo seu estudo ainda é extremamente importante visto que surtos infecciosos envolvendo espécies de flavivirus estão sempre surgindo ou reemergindo, muitas vezes levando ao desenvolvimento de doenças mais complexas que as anteriormente observadas (Who, 2018).

O DENV e ZIKV pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, que são vírus envelopados compostos por uma bicamada lipídica derivada do retículo endoplasmático da célula infectada, na qual se inserem as proteínas de envelope (E) e membrana (M). O nucleocapsídeo é composto por múltiplas cópias da proteína do capsídeo (C) complexadas a uma molécula de RNA de fita simples com polaridade positiva (Kuhn *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2004; Qi; Zhang; Che, 2008).

Este RNA viral codifica 7 proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 (Figura 27.) (Rodenhuis-Zybert; Wilschut; Smit, 2010). As NS estão relacionadas à replicação viral, à expressão das proteínas virais e à virulência dos sorotipos (Heinz; Stiasny, 2012; Simmonds *et al.*, 2017). A proteína NS1 pode ser encontrada no interior de células infectadas, associada à superfície destas células ou ainda pode ser secretada em grandes quantidades para o meio extracelular, sendo detectada no soro de indivíduos infectados durante a fase aguda da doença (Young *et al.*, 2000; Rastogi; Sharma; Singh, 2016).

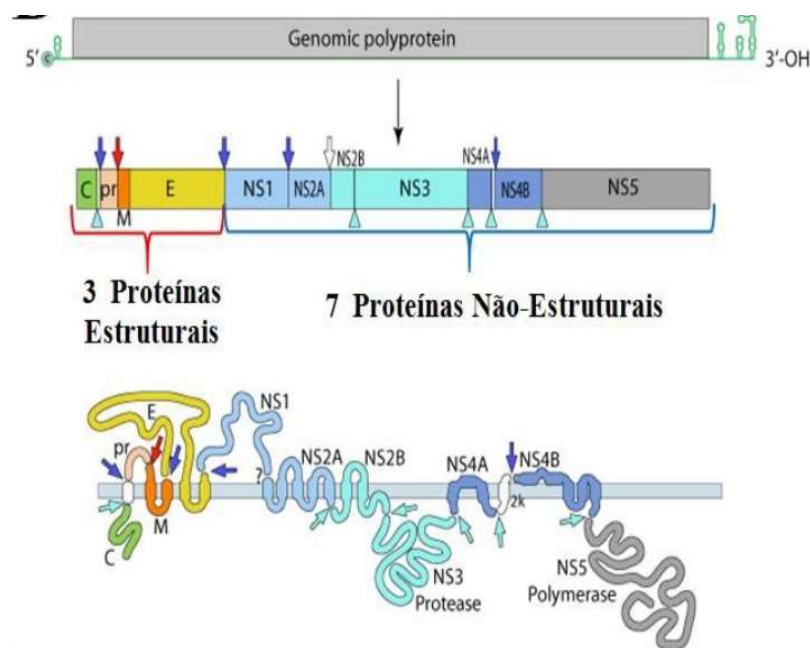


Figura 27. Esquema representativo das proteínas virais estruturais (C, M e E) e não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) presentes em todos Flavivírus. Adaptado de (Basso, 2019).

A NS1 é uma glicoproteína que dependendo do seu estado de glicosilação apresenta tamanho de 46 a 55 kDa e pode ser secretada como lipopartícula hexamérica no meio extracelular (sNS1) ou estar associada à membrana (mNS1), tanto na superfície celular como em compartimentos vesiculares intracelulares induzidos pelo vírus (Muller; Young, 2013).

Embora o papel da proteína NS1 ainda não esteja bem elucidado, vários trabalhos propuseram seu envolvimento na patogênese, associando esta proteína ao desenvolvimento das formas mais graves da doença (Libraty *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002; Avirutnan *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2012; Amorim *et al.*, 2014). Em contraposição, outros trabalhos ressaltam que a proteína NS1 assim como anticorpos gerados contra esta proteína são promissores objetos de estudo para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus da Dengue (Gonçalves *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2017; Hertz *et al.*, 2017).

A grande dificuldade está em se adotar estratégias de imunização eficientes visto que deve conferir imunidade protetora simultânea para os quatro sorotipos. O que temos é que a infecção por um sorotipo torna o indivíduo imune a este sorotipo, mas este continua susceptível aos outros sorotipos virais (Guha-Sapir; Schimer, 2005) que numa segunda reinfecção pode ocorrer um agravamento do quadro clínico. Desta forma, duas vacinas na fase 3 de desenvolvimento estão prestes a entrar no mercado, a TDV produzida pela Takeda Farmacêutica e a LAV Delta 30 desenvolvida pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH) Instituto Butantan (Bos; Gadea; Despres, 2018). Mas a vacina que já circula no mercado é a Dengvaxia, a qual alguns grupos de pesquisa construíram vírus quiméricos FA17D-DENV, com as proteínas prM e E dos quatro sorotipos do vírus da dengue e realizaram testes quanto à imunogenicidade em humanos e capacidade de infectar mosquitos vetores (Guy; Saville; Lang, 2010). Esses vírus foram geneticamente e fenotipicamente estáveis, mais atenuados em comparação ao vírus 17D de FA e incapazes de infectar mosquitos. Os resultados da fase II dos testes clínicos mostraram que a proteção contra o sorotipo 2 do DENV foi baixa. Após a fase III, a vacina Dengvaxia foi aprovada e lançada no Brasil em dezembro de 2015. Entretanto, no final do ano de 2017, o acompanhamento de longo prazo de pessoas vacinadas revelou diferenças de aceitação a vacina dos grupos vacinados, por exemplo em pessoas soronegativas, estes foram vacinados e logo após expostos ao vírus e observou um agravamento da doença. Portanto, segundo boletim divulgado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a vacina passou a ser recomendada somente para pessoas que já foram expostas alguma vez a qualquer sorotipo do vírus da dengue (Villar *et al.*, 2013). Ela ainda cita que essas informações foram apresentadas pelo próprio fabricante Sanofi-Pasteur, esclarecendo que a vacina em si não desencadeia o quadro da doença, mas se em contato com vírus pode vir a desenvolvê-la (Anvisa, 2018). Desta forma, é importante a investigação de métodos mais efetivos de controle da doença.

O diagnóstico é complexo e até recentemente, apenas laboratórios especializados eram capazes de confirmar definitivamente uma infecção por dengue. No entanto, esta realidade vem sendo alterada gradualmente com a disponibilização de testes rápidos capazes de detectar uma infecção por dengue rapidamente e podem ser aplicados até mesmo na atenção primária da saúde. Assim que constatado a doença é realizada análise dos sintomas clínicos apresentados pelo paciente associado com alterações do exame físico, mas ambos não são específicos, podendo resultar em um diagnóstico equivocado e errado, pois outras doenças podem apresentar sinais em comum com a dengue (Ranjit; Kisson, 2011). Após avaliação médica e suspeita que o paciente esteja com dengue, testes laboratoriais são requisitados para confirmar os grupos específicos. Testes sorológicos como Imunoglobulina M (IgM) e Imunoglobulina G (IgG) (Jahansahi, 2014), bem como ensaio de ELISA (Karoliny, 2016), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase [reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)] (Saxena, 2018), detecção da proteína não estrutural 1 (NS1) por testes rápidos [point-of-care (POC)] (Wang; Sekaron, 2010) e o teste imunocromatográfico rápido – *SD Bioesy Dengue Duo* (capacidade de detectar tanto IgM, como NS1 e IgG (Blacksell *et al.*, 2011) específico para dengue são os exames comumente realizados.

Os testes sorológicos são baseados na detecção de antígenos virais ou de anticorpos específicos contra o vírus. Esses consistem na utilização de kits comerciais disponíveis ou na detecção dos anticorpos IgM pelo método ELISA. Este teste é utilizado para detecção de anticorpos na fase aguda que apresenta títulos bem mais altos em uma infecção primária, proporcionando um diagnóstico bastante sensível e rápido (De Paula; Fonseca, 2004).

Apesar, de bastante sensíveis, os testes sorológicos não identificam a variedade viral infectante, principalmente devido à presença de reações cruzadas entre os diferentes sorotipos da dengue e outros flavivírus. Dessa forma, técnicas moleculares foram desenvolvidas para suprir esse tipo de necessidade. A técnica de RT-PCR é capaz de detectar pequenas quantidades do vírus, seja por viremia baixa ou por má qualidade da amostra e identificar o sorotipo viral rapidamente (Fonseca; Fonseca, 2002). Esta técnica baseia-se na amplificação de regiões específicas do material genético do organismo, por meio da utilização de iniciadores específicos para a região alvo do genoma. Uma vez identificadas essas regiões específicas do genoma pelos iniciadores ocorre a amplificação exponencial desse segmento específico do cDNA. As duas tecnologias associadas a este método são o sistema TaqMan® (Roche Diagnostics) e o sistema SYBR Green (Paudel *et al.*, 2011).

O teste imunocromatográfico rápido – *SD Bioesy Dengue Duo* Dengue DUO é de uso in vitro, qualitativo, rápido e visual para detecção diferencial dos anticorpos IgG/IgM e Antígeno NS1 do vírus da Dengue sorotipos 1-4 em amostras de soros, plasmas e ou sangue total. O teste é indicado para uso profissional no diagnóstico das infecções com vírus da Dengue. Estudos sorológicos têm mostrado que durante infecção primária, anticorpos IgM Dengue-específicos são encontrados a partir do 5º dia da infecção e permanecer na circulação por 30-60 dias, enquanto os anticorpos IgG aparecem no 14º dia de infecção e persiste por toda vida. Em contraste, durante a infecção secundária da Dengue, os níveis de IgG e IgM específicos aumentam significativamente em 1-2 dias e 20º dia após a infecção, respectivamente. Assim, diferentes perfis de respostas imunes humorais em infecções virais de dengue primária e secundária podem ser utilizados para o diagnóstico diferencial. Isto é de relevância clínica em prever a progressão e o prognóstico da doença.

No entanto para o diagnóstico de Zika, foi deferido três produtos, dentre eles, um de origem nacional e dois de origem alemã. O primeiro é fabricado pelo Quibasa, laboratório mineiro, e é denominado *Bio Gene Zika Virus*. Este kit se baseia na identificação do genoma viral por meio da técnica qPCR do vírus na fase aguda da doença e circulante no sangue e então, se caracteriza como um método direto de diagnóstico (Anvisa, 2016).

Os últimos dois foram fabricados pela empresa Euroimmun e permitem a identificação simultânea de anticorpos de ZIKV, além de DENV e CHIKV por imunofluorescência indireta (IIFT). Estes kits são chamados de *IF: Mosaico Arbovírus 2 IgG*, para a detecção do período pós-infecção, e *IF: Mosaico Arbovírus 2 IgM*, para a fase aguda da infecção. Além disso, o primeiro teste rápido para a detecção de anticorpos IgM e IgG contra ZIKV foi desenvolvido pela Fundação Bahiafarma e fabricado pela empresa canadense Biocan Diagnostics INC. Este kit também foi aprovado e registrado pela Anvisa e, assim como os demais kits de detecção de anticorpos, é um método indireto de diagnóstico (Anvisa, 2016).

Contudo, estes testes citados não combinam ainda com alta sensibilidade, especificidade e rapidez para serem utilizados como ferramentas únicas de diagnóstico e em alguns casos, podem levar dias para obtenção dos resultados, e ainda correm o risco de resultados falsos positivos em decorrência da reação cruzada com outros flavivírus, além de um alto custo de análise e pessoas capacitadas para realização (Jahanshahi, 2014; Karoliny, 2016).

Além do prejuízo na saúde da pessoa que contrai a doença, esta também causa um grande impacto econômico no país e no mundo, fazendo com que os governos invistam tempo e dinheiro no desenvolvimento de ferramentas para o seu diagnóstico. Podemos citar como

custos diretos aos cofres públicos gastos com medicamentos, hospitais, campanhas de prevenção, eliminação do mosquito, despesas trabalhistas, entre outros. Já os custos indiretos abrangem baixa produtividade no ambiente de trabalho pelo paciente levando a um baixo rendimento da empresa, baixa qualidade de vida e outros fatores. Atualmente, o que torna onerosa a produção dos kits diagnósticos é a obtenção de grande quantidade do antígeno que captura os anticorpos (Mayer; Tesh; Vasilakis, 2017). Desta forma um teste que seja capaz de disponibilizar resultados rápidos, confiáveis, com disponibilidade de antígeno em grande quantidade a custos baixos, com acurácia adequada para o diagnóstico clínico e validado no Brasil, seguindo as características genéticas, morfofisiológicas e culturais do país ainda é um grande desafio.

Para isto, neste trabalho, foi desenvolvido o sistema para expressão de peptídeos imunogênicos de NS1 (múltiplos determinantes antigênicos encontrados no segmento de NS1 de DENV-1, entre os resíduos de aminoácidos 57 a 126 (Mason *et al.*, 1990). Este sistema é inovador e tem o potencial para o uso na diagnose da infecção pelos vírus DENV e ZIKV.

2. OBJETIVO

Desenvolvimento de um sistema de diagnóstico para DENV e ZIKV mais acessível; sensível; específico e de fácil manipulação.

2.1. Metas

- Clonagem dos peptídeos imunogênicos do gene NS1 (AP-NS1) de dengue (sorotipos 1 a 4) e AP-NS1 de zika no vetor de transferência;
- Construção de baculovirus recombinantes e expressão das proteínas recombinantes em células de inseto;
- Purificação das proteínas recombinantes produzidas
- Padronização de ELISA indireto para avaliação da sensibilidade;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Vírus

Os vírus DENV-1, DENV-2 e DENV-4, foram cedidos pelo Laboratório de Virologia do LACEN-DF para extração de RNA. O RNA de DENV-3 foi cedido pelo Laboratório de Flavivirus (LABFLA) IOC-Fiocruz-RJ (Domingues, 2013). E o vírus ZIKV (isolado africano) foi doação do laboratório do professor Zanotto da USP-SP.

3.2. Extração de RNA viral

O RNA total de células infectadas com DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (Domingues, 2013) foram purificados utilizando o reagente Trizol LS (Invitrogen) segundo protocolo recomendado pelo fabricante com adaptações. Inicialmente, foi preparada uma solução contendo 1/3 do extrato de células e 2/3 de Trizol LS, que foi incubado por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1/5 do volume da solução de clorofórmio livre de RNase, agitado manualmente por 15 s e incubado por 7 min à temperatura ambiente. A solução foi então centrifugada a 12.000 rpm por 15 min (Centrifuga Eppendorf 5418) e a fase aquosa contendo o RNA foi transferido para um novo tubo, adicionado 1/2 do volume de isopropanol livre de RNase, incubado 10 min à temperatura ambiente, e por fim, centrifugado 12.000 rpm por 10 min (Centrifuga Eppendorf 5418). Finalmente, o sobrenadante foi removido e adicionado etanol 75% livre de RNase, e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. O precipitado formado foi ressuscitado em ddH₂O livre de RNase.

3.3. Construção dos baculovirus vírus recombinantes

O plasmídeo pFB1-6xhis-AcPH (Ardisson - Araújo *et al.*, 2015) representado na figura 28, foi utilizado para clonagem dos genes de interesse.

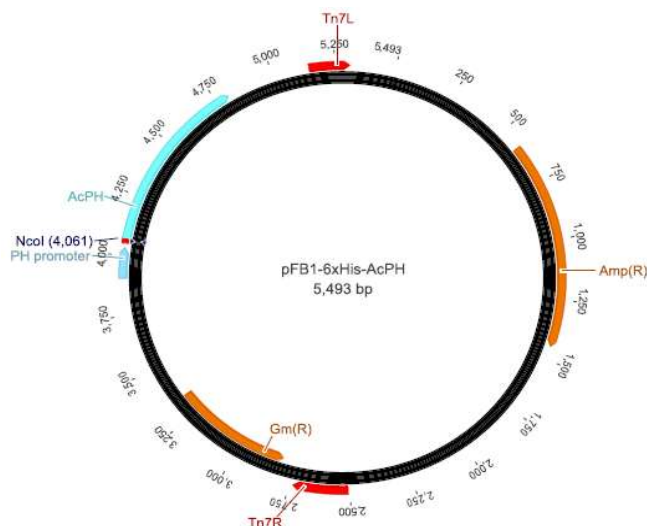


Figura 28. Mapa representativo do plasmídeo pFB1-6xHis-AcPH. O plasmídeo pFB1-6xHis-AcPH, apresenta sítio de restrição para a enzima *NcoI*, que foi usado para clonagem dos genes de interesse, gene de resistência a ampicilina (Amp) e gentamicina (Gm), regiões de transposição Tn7R e Tn7L. Mapa construído usando programa Geneious (Biomatters Limited).

3.4. Amplificação de fragmentos de DNA contendo os genes NS1 dos peptídeos dos diferentes sorotipos de DENV

3.4.1. RT-PCR

O cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa (RT-PCR) (Domingues, 2013). A reação consistiu de RNA total (10 μ L \sim 17 ng/ μ l); oligonucleotídeo iniciador (primer) reverso (Conc. final = 50 mM) específico para NS1 do DENV 1, 2, 3 ou 4 (Tabela 1); dNTP (10mM); 200 unidades da enzima Superscript Reverse Transcriptase (Invitrogen); First-Strand Buffer; 1 unidade de RNase out (Invitrogen) e DTT (0,1mM), incubados a 45°C por 1 h, em seguida desnaturado a 75°C por 15 min. Por fim, adicionado 50 unidades de RNase H (Promega) e incubação a 37°C por 30 min.

3.4.2. PCR

Na reação de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA foram utilizados o cDNA construído a partir dos RNAs dos peptídeos da NS1 de DENV 1 a 4 e do peptídeo de ZIKV, onde cada amplificação foi realizada com oligonucleotídeos específicos: 5 μ L do tampão de reação 5X da enzima Taq DNA polimerase (Long amp® *Taq* DNA Polymerase, NEB), 1 μ L da mistura dos quatro dNTPs (solução estoque 10mM), 1 μ L dos oligonucleotídeos específicos para cada gene (“*Forward*”-F e “*Reverse*”-R) (solução estoque 10 μ M) conforme (tabela 2), 0,5 μ L do DNA (\sim 50 ng/ μ l), 2U (unidades) da enzima Taq DNA polimerase (Long amp® *Taq*

DNA Polymerase, NEB) e água “milli-Q” para um volume final de 50 µl. O seguinte programa foi utilizado: 94°C/2 min, 30 ciclos de 94°C/30 seg, 60°C/15 seg, 72°C/60 seg e 72°C/10 min para o término da extensão. Os resultados esperados para os fragmentos de PCRs, são de 200 pb. As reações de PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% de acordo com o protocolo descrito em Sambrook; Fritsch; Maniatis, (1989).

Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos utilizados no trabalho para amplificação dos peptídeos de NS1 de DENV 1-4 e ZIKV.

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIAS
DENV 1 peptídeo de NS1 <i>For</i>	5'-GG AGG GCG ACA TGT CCA TTC GAT CA-3'
DENV 1 peptídeo de NS1 <i>Ver</i>	5'-CAT TTT ACA TGT GTG CTC CTA TGA TTT -3'
DENV 2 peptídeo de NS1 <i>For</i>	5'-G CTA TCC AAA ACA TGT CCG AAA AGG G-3'
DENV 2 peptídeo de NS1 <i>Ver</i>	5'- CTG TGG AGA GCA ACA TGT CCT TTC CC-3'
DENV 3 peptídeo de NS1 <i>For</i>	5'-GA ATG GAG ACA TGT CCA TTA GGT C AAC AAC C-3'
DENV 3 peptídeo de NS1 <i>Ver</i>	5'- GG AAT TTT ACA TGT GAG CTG TCA CTA TTT TTG C-3'
DENV 4 peptídeo de NS1 <i>For</i>	5'-AG ATG GGG ACA TGT CCA TTA GAT CAA CCA CGA-3'
DENV 4 peptídeo de NS1 <i>Ver</i>	5'- GC TGT TTC ACA TGT GAG GGG TGA AGA TTT TTG C -3'
ZIKV peptídeo <i>For</i>	5'- GAATCCTTATCAATTAAGATAAAAAGATAAGATTATTAATC-3'
ZIKV peptídeo <i>Ver</i>	5'- GCGGCCGCAATAATGATACAATTTTTATTATTACATTTAATAT- 3'
M13 <i>For</i>	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'
M13 <i>Ver</i>	5'-GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3'
pFAST amino <i>For</i>	5'-GGATCCCATATGCATCATCATCATCATTCCATGG-3'
pFAST amino <i>Ver</i>	5'-GGATCCCTCGAGTTAATACGCCGGACCAGTGAACAGA-3'

3.5. Clonagem dos fragmentos obtidos na PCR no vetor pGEM®-T Easy Vector

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR foram purificados a partir do gel de agarose usando o kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante. Estes fragmentos foram então ligados no vetor pGEM®-T Easy Vector (Promega), conforme instruções do fabricante gerando os plasmídeos recombinantes pGEMDENVAP-1, pGEMDENVAP-2, pGEMDENVAP-3 e pGEMDENVAP-4 e pGEMZIKVAP.

A confirmação destas clonagens foi realizada por digestão destes plasmídeos com a enzima de restrição *EcoRI* (5 µl de DNA ~30 ng/µl, 1U de enzima - Promega, 0,1 µL BSA 10X,

1 µL do tampão de reação 10X, e água “milli-Q” para um volume final de 10µL). Uma vez confirmado a clonagem, estes plasmídeos recombinantes foram sequenciados (Macrogen, Coréia do Sul).

3.6. Clonagem dos fragmentos no vetor de transferência codificando os peptídeos do gene NS1

Os peptídeos AP-DENV1, AP-DENV2, AP-DENV3, AP-DENV4 e AP-ZIKV foram digeridos com a enzima de restrição *PciI* (NEB) (10 µl de DNA ~30 ng/µl, 1U da enzima, 1,5 µL BSA 10X, 2,5 µL do tampão de reação 10X, e água “milli-Q” para um volume final de 20µL), e incubada a 37°C por 16 h, e clonados separadamente em pFB1-6xhis-AcPH que previamente digerido com a enzima de restrição *NcoI*, NEB (20 µl de DNA ~30 ng/µl, 1U da enzima, 0,4 µL BSA 10X, 4 µL do tampão de reação 10X, e água “milli-Q” para um volume final de 40µL) em estufa a 37° C por 16 h (“*overnight*”).

O vetor pFB1-6xhis-AcPH ainda foi desfosforilado utilizando 1 µg de DNA plasmidial digerido e 15 U da enzima TSAP (Fosfatase alcalina termo-sensível - NEB), seguindo especificações do fabricante. A reação foi incubada 15 min a 37°C e 5 min a 65°C.

Após desfosforilação do vetor, este foi ligado aos fragmentos de DNA de interesse removidos dos plasmídeos pGEMDENVAP-1, pGEMDENVAP-2, pGEMDENVAP-3 e pGEMDENVAP-4 pela reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase (Promega), (8 ul de DNA inserto ~10,2 ng/µl, 1U da enzima, 5 µL de DNA vetor ~22 ng/µl e 1,5 µL do tampão de reação 10X para um volume final de 15 µL) por 16 h entre 2 a 8°C. Na sequência, foi feita uma transformação por eletroporação com células *E. coli* DH10B eletro-competentes comerciais (Invitrogen) desta reação de ligação conforme Sambrook; Russel, (2001). Os clones obtidos foram selecionados pela resistência aos antibióticos ampicilina e gentamicina e em seguida, foram submetidos a uma purificação por lise alcalina, conforme Sambrook; Fritsch; Maniatis, (1989).

A confirmação dos clones obtidos foi realizada por PCR utilizando os primers AP-DENV F específicos para cada clone e o primer pFASTamino R (Tabela 2) 12 µg do DNA plasmidial, 10 U de enzima Taq DNA Polimerase MasterMix (GoTaq) e água “milli-Q” para um volume final de 10 µL e o mesmo programa previamente utilizado para obter os fragmentos alvo conforme item 3.4.2. O AP-ZIKV foi digerido com a enzima de restrição *HindIII* (Promega) (5 µl de DNA ~30 ng/µl, 1U da enzima, 0,1 µL BSA 10X, 1 µL do tampão de reação 10X, e água “milli-Q” para um volume final de 10µL). Os plasmídeos recombinantes que

amplificaram os fragmentos referentes aos peptídeos clonados foram sequenciados (Macrogen, Coréia do Sul).

3.7. Construção dos baculovírus recombinantes

Os vetores de transferências recombinantes construídos foram utilizados para construção dos baculovírus recombinantes, utilizando o sistema Bac-to-Bac® “*Baculovirus Expression System*” (Invitrogen) disponível comercialmente que foi desenvolvido na década de 1990.

Foram utilizadas células *E. coli* DH10Bac que possuem o bacmídeo, o genoma completo de baculovírus em forma de um grande plasmídeo capaz de se replicar em *E. coli*, e ainda ser infectivo quando transfectado em células de inseto em cultura. E ainda, um plasmídeo chamado Helper, que codificam enzimas transposases, capazes de reconhecer sítios de transposição do vetor de transferência e o bacmídeo, para que o gene de interesse seja transposto do vetor de transferência para o bacmídeo (Luckow *et al.*, 1993).

Estes plasmídeos foram transformados, por choque térmico, em células DH10Bac™. Os transformantes foram selecionados pelos antibióticos tetraciclina (10µg/ml), gentamicina (7µg/ml), canamicina (50µg/ml); e pelos marcadores de seleção IPTG (40µg/ml) e X-Gal (100µg/ml) após 48 h em estufa a 37°C. As colônias brancas foram coletadas e purificadas por lise alcalina conforme Sambrook *et al.* (1989).

A confirmação dos baculovírus recombinantes foi feita através de uma reação de PCR, onde foram utilizados: 5 µL do tampão de reação 10X da enzima Taq DNA polimerase Master Mix (*Taq* DNA Polymerase, Promega), 0,5 µL do oligonucleotídeo primer de cada gene F (Tabela 2) (solução estoque 10µM), 0,5 µL do oligonucleotídeo M13 R (solução estoque 10µM) conforme (tabela 2), 0,5 µL do DNA (~50 ng/ µl), e água “milli-Q” para um volume final de 10 µl. O seguinte programa foi utilizado: 93°C/3 min, 30 ciclos de 94°C/45 seg, 60°C/45 seg, 72°C/5 min e 72°C/7 min para o término da extensão. O resultado da PCR cujo tamanho esperado é de 1.800 pb, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Uma vez a clonagem confirmada, o DNA plasmidial da célula DH10Bac™ contendo os bacmídeos recombinantes, foram utilizados para transfectar células de inseto BTI-Tn5B1-4 e posteriormente infectar novas linhagens de células no intuito de amplificar os vírus recombinantes, segundo O Reilly; Miller; Luckow, (1992).

Para verificar se o título viral destes vírus construídos era satisfatório para os testes de expressão que estes foram submetidos, foi realizado titulação viral, utilizando o método de

diluição seriada em placa de 96 poços (“*End-point dilution assay*”) descrito no Capítulo II, (item 4. 3, página 67) conforme metodologia de Reed; Muench, 1938.

3.8. Análise de expressão das proteínas recombinantes

Garrafas de 75 cm² com células de inseto BTI-Tn5B-4 (5×10^6) foram infectadas com os baculovirus recombinantes produzidos com MOI 1 (multiplicidade de infecção de 1 vírus por célula). Após 72 h p.i., as células infectadas foram coletadas e centrifugadas a 5000 rpm por 5 min (Centrífuga Legend XT Centrifuge - Sorvall), o sobrenadante estocado a 4°C, enquanto o precipitado foi lavado 3 vezes com PBS 1X com inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich 10 µg/mL). Esses precipitados (10 µl) foram aplicados e analisados em dois géis de poliacrilamida, por SDS-PAGE a 12% (Laemmli, 1970), utilizando o aparato Mini Protean II (Bio-Rad), conforme protocolo fornecido pelo fabricante e por *Western blot* (Sambrook; Russel, 2001). Um dos géis foi corado em solução de 40% de metanol, 10% de ácido acético e 0,1% de corante Azul brilhante de Coomassie R-250 por 16 h. O outro gel foi utilizado para transferência das proteínas em uma membrana de nitrocelulose (Gibco BRL- Life Technologies) (*Western blot*) seguindo as instruções do aparato de transferência Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) e utilização do tampão de transferência *Bjerrum and Schafer-Nielsen* (48mM de Tris, 39mM de glicina, 20% de metanol, pH 9,2) por 10 min.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de PBS 1X (100 mM Na²HPO₄, 17 mM KH₂PO₄, 1,4 mM NaCl e 27 mM KCL) e 3% de leite em pó desnatado por 16 h. Depois, a membrana foi lavada três vezes com PBS Tween (0,05%) por 5 min, em seguida recebeu solução de PBS/albumina bovina (BSA) 0,5% com o anticorpo primário policlonal anti-His (GE Healthcare) de camundongo, por 1 h sob leve agitação. A membrana foi lavada novamente três vezes em PBS Tween (0,05%) por 5 min e incubada em PBS/BSA 0,5% com o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo, conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) por mais 1 h sob leve agitação. Após o tempo, a membrana foi lavada mais três vezes com PBS Tween (0,05%) por 15 min e uma solução reveladora, NBT/BCIP (Invitrogen) foi adicionada servindo de substrato para a ação da fosfatase alcalina. Este foi mantido protegido da luz até a conversão do substrato, marcando assim, a proteína de interesse devido à presença da enzima conjugada ao anticorpo secundário que se ligou ao anticorpo primário específico. A reação foi interrompida com lavagens de água destilada para evitar marcação inespecífica.

3.9. Teste de purificação das proteínas recombinantes (AP-DENV1, AP-DENV2, AP-DENV3 e AP-DENV4)

As células de inseto BTI-Tn5B-4 foram infectadas com os baculovírus recombinantes separadamente com MOI=10 em garrafas de 75 cm² (TPP). Após 4 d. p. i., as células infectadas foram coletadas e centrifugadas a 5000 rpm por 5 min (Centrífuga Legend XT Centrifuge - Sorvall), o sobrenadante estocado a 4 °C, e o precipitado foi lavado 3 vezes com PBS 1X e acrescentado inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich 10µg/mL). Este precipitado foi ressuscitado em 3 ml de Tris EDTA (TE, 10 mM Tris, 1 mM EDTA).

Em seguida, as amostras foram sonicadas quatro vezes com duração de 15 s cada com três intervalos de 15 segundos e velocidade 20 kHz no Sonicador Ultrassônico (Bandelin Sonoplus), e centrifugada a 5.000 rpm por 10 min (Centrífuga 5418 Eppendorf). Para melhor purificação dos peptídeos de DENV, foi adicionado em 13 eppendorfs 300 ng/µl de cada peptídeo e estes foram tratados com diferentes detergentes e concentrações conforme (tabela 3). Foram feitos também outros 13 eppendorfs com 300 ng/µl de cada peptídeo, que não receberam nenhum tratamento de purificação.

Tabela 3. Diferentes detergentes e concentrações usadas para determinar melhor purificação dos peptídeos AP de DENV

Peptídeos Denvs	Detergentes e Concentrações			
Controles (DENV 1 a 4)	Sem purificação	Sem purificação	Sem purificação	Sem purificação
DENV 1 AP	SDS 0,1; 0,25;0,5%	Tween 20 1; 2,5; 5%	Triton X-100 1; 2,5; 5%	Nonidet 1; 2,5; 5%
DENV 2 AP	SDS 0,1; 0,25;0,5%	Tween 20 1; 2,5; 5%	Triton X-100 1; 2,5; 5%	Nonidet 1; 2,5; 5%
DENV 3 AP	SDS 0,1; 0,25;0,5%	Tween 20 1; 2,5; 5%	Triton X-100 1; 2,5; 5%	Nonidet 1; 2,5; 5%
DENV 4 AP	SDS 0,1; 0,25;0,5%	Tween 20 1; 2,5; 5%	Triton X-100 1; 2,5; 5%	Nonidet 1; 2,5; 5%

Os precipitados que foram ressuscitados com Tween 20; Triton X-100 e Nonidet foram lavados 3 vezes, já os tratados com SDS foram lavados apenas 2 vezes, ressuscitados em 0,5M NaCl (Cloreto de Sódio - Vetec) e centrifugados 5 min a 5.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5418). O último precipitado formado foi ressuscitado em PBS 1X com inibidor de

protease e aplicados e analisados em géis de poliacrilamida, por SDS-PAGE a 12% (Laemmli, 1970), utilizando o aparato Mini Protean II (Bio-Rad), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Após padronização dos detergentes os recombinantes de DENV AP 1 a 4 e o AP-ZIKV passaram pelo processo de purificação conforme descrito acima.

3. 10. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) dos cristais obtidos pela purificação dos AP de NS1 de DENV e ZIKV.

Trinta microlitros de cristais proteicos purificados receberam o mesmo volume de acetona 100%, e foram incubados em estufa a 37°C por 30 min. Essas misturas foram espalhadas no suporte porta-amostra do microscópio ('stub') e novamente incubadas a 37°C por 30 min até ser observada a secagem completa. Em seguida, uma fina camada de ouro em pó foi depositada nas amostras pelo período de 90 s, pelo metalizador Leica modelo EM SCD500, para tornar o material bom condutor térmico e elétrico. A visualização foi realizada no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-70014 Field Emission Scanning Electron Microscope).

3.11. ELISA indireto dos peptídeos recombinantes de NS1 de dengue

O ELISA indireto foi realizado no Laboratório de Flavivírus (LABFLA), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro.

Todos os soros de pacientes utilizados neste trabalho foram retirados do banco de dados do LABFLA de projetos em andamento, previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos – protocolo 45/2017.

As amostras analisadas foram coletadas do primeiro ao sétimo dia após o aparecimento dos sintomas, ou seja, os soros positivos utilizados foram de pacientes em fase aguda de infecção e foram confirmados por PCR ou Isolamento viral ou ambos durante a rotina do laboratório. No total, 188 amostras de DENV foram utilizadas durante os testes, dentre elas 48 para APDENV-1, 46 para APDENV-2, 47 para APDENV-3 e 47 para APDENV-4.

Para realização deste teste, placas de 96 poços (*Costar*, Corning Inc.) foram sensibilizadas com os 4 peptídeos de DENV (5 ug de cristais protéicos por poço) de APDENV-1 (0,324 ug/ μ l), APDENV-2 (0,245 ug/ μ l), APDENV-3 (0,501 ug/ μ l), APDENV-4 (0,426 ug/ μ l) e incubadas a 4°C *overnight*. Após este período foi realizado três lavagens consecutivas em lavadora automática de microplacas (CE- Asys Atlantis, Biochrom) utilizando Tween 20 0,05% com PBS 1x pH=7,4 1 μ l/ml (100 μ l por poço). Em seguida é adicionada 200 μ l por

poço de solução de bloqueio tampão PBS 1x pH=7,4 1ul/ml com soro de cabra 3,5% (Sigma-Aldrich), e incubado em estufa à 37 °C por 1 h. Novamente é realizado três lavagens com Tween 20 0,05 % com PBS 1x pH=7,4 1 µl/ml (100 µl por poço). Logo após, foram adicionadas amostras de soro humano (diluição 1:10) em tampão de diluição de soro e conjugado (3% NFDM) e incubado a 37 °C por 1 hora. E, mais três lavagens com Tween 20 0,05 % com PBS 1x pH=7,4 1 µl/ml (100 µl por poço) foram realizadas. Logo, adição de 100 µl por poço de anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) (diluição 1:1000) em PBS 1x pH=7,4 e 3% de leite em pó desnatado incubado a 37 °C por 1 h. Novas lavagens com Tween 20 0,05 % e PBS 1x pH=7,4 1 µl/ml (100 µl por poço). Por fim, a revelação é realizada com adição de 100 µl por poço de substrato ABTS® e Peroxidase (Peroxidase Substrate System), na proporção 1:1 e incubados a temperatura ambiente por 1 h. A leitura do teste foi feita por meio de métodos colorimétricos (densidade óptica - DO) utilizando o espectrofotômetro para leitora de microplacas de ELISA (Multiskan EX – Thermo Scientific) com filtro de 450 nm. O ponto de corte na absorbância para a interpretação do teste como positivo foi 0,1. Foram considerados positivos os soros que apresentaram resultado maior ou igual a 0,1.

4. RESULTADOS

4.1. Amplificação dos peptídeos de NS1 de DENV 1 a 4 e ZIKV.

As figuras 30, A - F esquematiza as construções que foram realizadas com o baculovírus AcMNPV, os peptídeos imunogênicos de NS1 (APDENV 1 a 4), e o peptídeo de NS1 de ZIKV (APZIKV).

Uma PCR com oligonucleotídeos específicos de cada gene foi realizada e obtidos 5 fragmentos de 200 pb referentes aos peptídeos imunogênicos de NS1 (APDENV 1; APDENV 2; APDENV 3 e APDENV 4) e APZIKV, conforme figura 31 A e B.





Figura 30. Esquema representativo das fusões do gene da poliedrina (*polh*) de AcMNPV com parte dos genes dos peptídeos da proteína NS1 dos vírus DENV 1-4 e ZIKV. Em **A**, temos o esquema do gene 6xHisAcPH. Em **B**, temos a fusão do gene PepZIKVNS1. Em **C**, a fusão do gene PepDENV1 ao gene *Polh*. Em **D**, a fusão do gene PepDenv2 ao gene *Polh*. Em **E**, a fusão do gene PepDenv3 ao gene *Polh*. E em **F**, a fusão do gene PepDenv4 ao gene *Polh*. As sequências de amino ácidos e massa molecular das proteínas recombinantes estão mostradas abaixo e ao lado de cada esquema. A posição de cada peptídeo (retângulo azul) e do promotor (PH) do gene da poliedrina (seta) também são mostrados na figura.

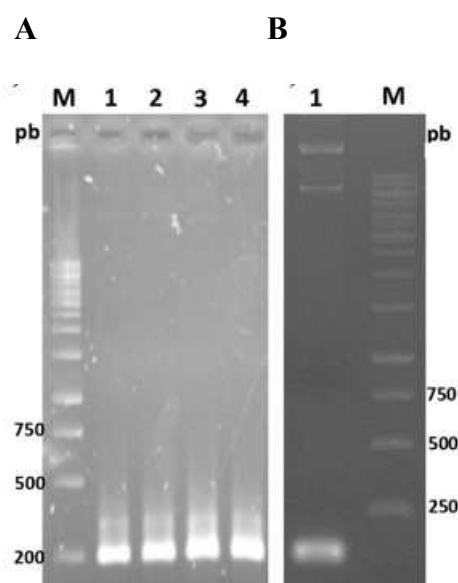


Figura 31. Amplificação de fragmentos de DNA correspondentes ao gene NS1 dos APDENV 1-4 e ZIKV. Eletroforese de gel de agarose 0,8% mostrando em **A**, a amplificação dos fragmentos de DNA relativos aos peptídeos AP de NS1 dos vírus DENV 1 a 4 (poços, 1 a 4, respectivamente). E em **B**, amplificação do fragmento de DNA do peptídeo AP de NS1 do vírus ZIKV. **M**) Marcadores GeneRule 1kb DNA Ladder (Fermentas) e 1 kb DNA ladder (Promega).

4.2. Confirmação da clonagem no vetor pGEM® T Easy

Os fragmentos confirmados por PCR foram previamente purificados e utilizados para ligação no vetor pGEM T Easy, originando 5 plasmídeos recombinantes que foram confirmados por digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Promega) gerando fragmentos de 200 pb referente aos peptídeos pGEMAPDENV 1-4 e ao APZIKV respectivamente demonstrados na figura 32 A e B. Estes clones também foram confirmados por sequenciamento (Macrogen Inc., Coréia do Sul).

4.3. Confirmação da clonagem nos vetores de transferência

Após confirmação das sequências clonadas por sequenciamento, os plasmídeos recombinantes foram digeridos e ligados separadamente no vetor pFB1-6xhis-AcPH previamente digerido. Os clones recombinantes demonstrados na figura 33 foram confirmados através da reação de PCR com os primers F de cada sorotipo e pFASTamino R conforme item 3.6, amplificando fragmentos de 700 pb, confirmando os plasmídeos recombinantes pFASTAPDENV 1, pFASTAPDENV 2, pFASTAPDENV 3, pFASTAPDENV 4 e

pFASTAPZIKV. As bandas inespecíficas acima de 750 pb podem ter ocorrido devido à baixa temperatura de anelamento usada.

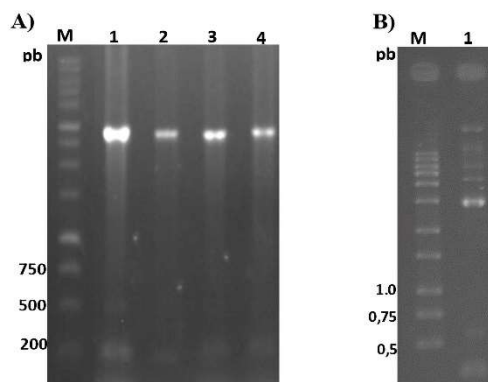


Figura 32. Confirmação da clonagem dos fragmentos dos genes NS1 de DENV 1-4 e ZIKV no vetor de clonagem pGEM®T Easy (Promega). Eletroforese de gel de agarose 8% mostrando em **A e B**, digestão de DNA dos plasmídeos recombinantes mostrando fragmento de 200 pb liberados pela enzima de restrição *EcoRI* (Promega) referentes aos fragmentos de DNA codificando os peptídeos de NS1 APDENV 1-4 (A) e NS1 ZIKV (B) confirmando a clonagem dos insertos no vetor pGEM®T Easy; **M**) Marcador 1kb (Promega). **1)** APDENV1; **2)** APDENV2; **3)** APDENV3; **4)** APDENV4.

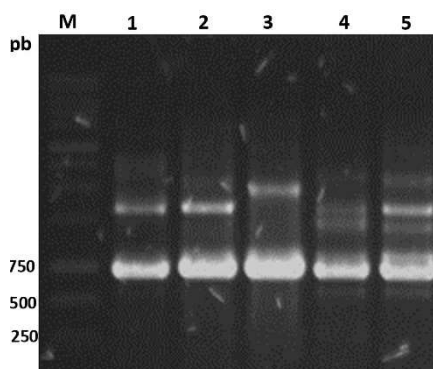


Figura 33. Confirmação da clonagem dos fragmentos de DNA referentes aos peptídeos AP de NS1 no vetor de transferência pFB1-6xhis-AcPH. Eletroforese em gel de agarose 8% mostrando o resultado da amplificação por PCR com os primers F de cada sorotipo e o pFast amino R dos fragmentos referentes aos peptídeos AP de DENV e ZIKV no vetor de transferência. Na figura, temos fragmentos de 700 pb confirmando a clonagem no vetor pFB1-6xhis-AcPH; **M**) Marcador 1kb ladder (Promega). **1)** APDENV1; **2)** APDENV2; **3)** APDENV3; **4)** APDENV4 e **5)** APZIKV.

4.4. Confirmação dos baculovírus recombinantes

Os vetores de transferência recombinantes contendo os fragmentos de DNA dos peptídeos de NS1 foram confirmados por sequenciamento e utilizados para construção dos bacmídeos recombinantes através do sistema Bac-to-Bac® Baculovírus Expression System (Invitrogen). Estes bacmídeos foram confirmados por PCR com combinação de

oligonucleotídeos conforme item 3.7 e resultaram em fragmentos de 1800 pb conforme figura 34. Os bacmídeos resultantes foram denominados BacAPDENV1, BacAPDENV2,

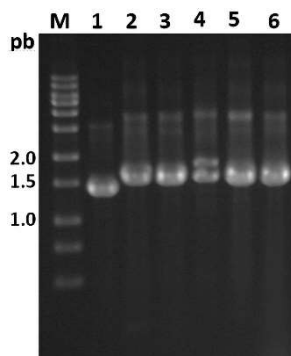


Figura 34. Confirmação da construção dos bacmídeos recombinantes. Eletroforese em gel agarose 8% mostrando a amplificação dos fragmentos de DNA esperados para a correta construção dos bacmídeos. Fragmentos de aproximadamente 1800 pb amplificados com combinações de primers M13 R com os primers F específicos de cada gene (Tabela 2). **M)** Marcador 1kb ladder (Ludvig). **1)** Controle; **2)** APDENV1; **3)** APDENV2; **4)** APDENV3; **5)** APDENV4 e **6)** APZIKV.

BacAPDENV3, BacAPDENV4, BacAPZIKV.

4.5 Confirmação da expressão das proteínas recombinantes

Após confirmação da correta construção dos bacmídeos recombinantes eles foram utilizados para transfecção em células Tn5B e sete dias após a transfecção, o sobrenadante foi coletado e novas células foram infectadas, onde é possível após 72 h. p. i., observar mudanças morfológicas nas células infectadas (núcleo hipertrófiado) e presença de corpos de oclusão semelhantes a cristais. Na figura 35, temos o controle (células não infectadas), o AcMNPV selvagem (células arredondadas e maiores com núcleo hipertrófico e presença de corpos de oclusão no núcleo), a infecção com o vAc6xhis-AcPH (presença de corpos de oclusão no núcleo), os APDENV 1-4 e o APZIKV (presença de uma massa proteica no citoplasma das células, fazendo com que as células pareçam maiores). Essa diferença na produção de corpos de oclusão é provavelmente causada pela mudança na estrutura da proteínas após a fusão.

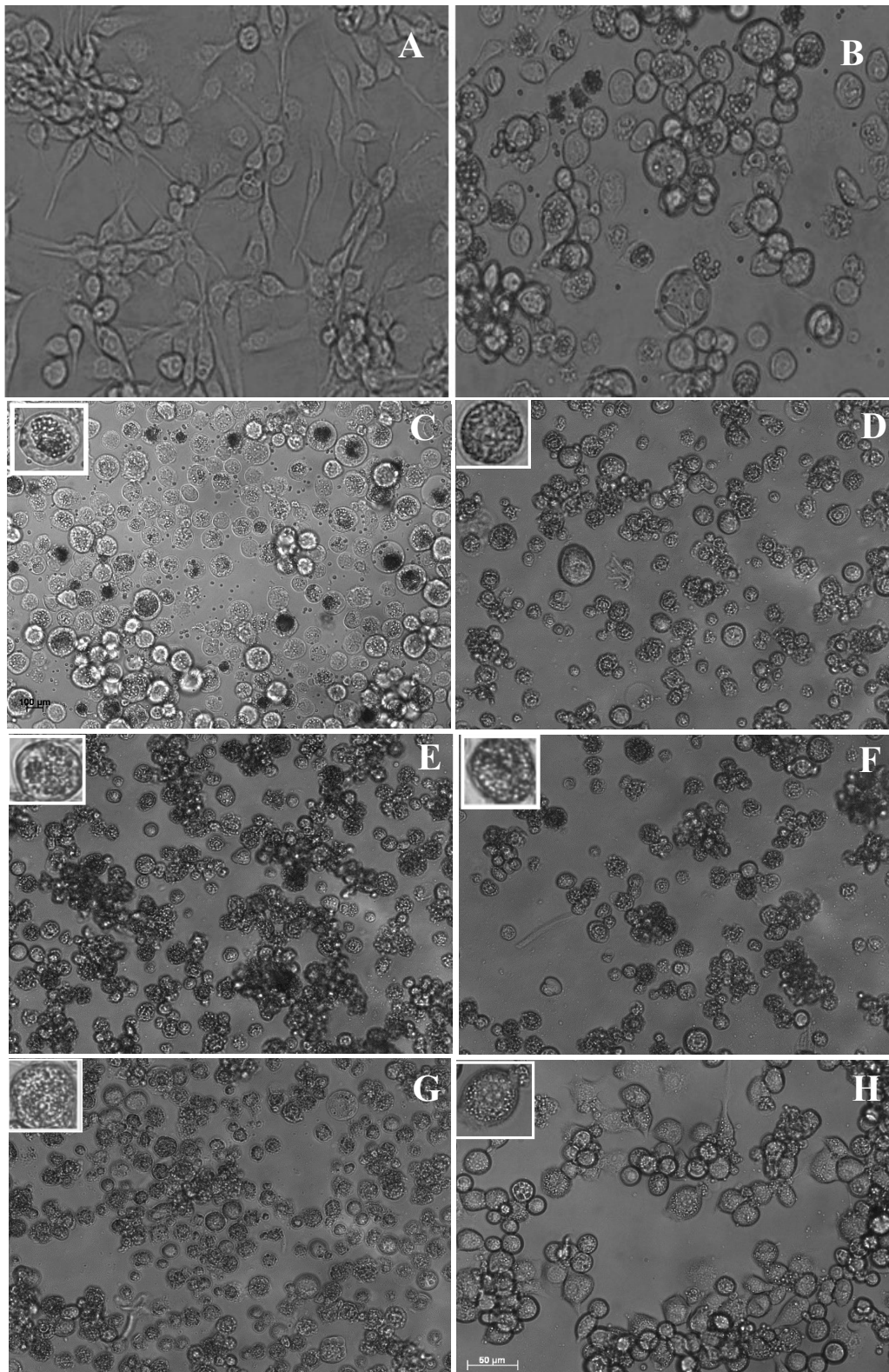


Figura 35. Análise estrutural da infecção de células de inseto Tn5B com os baculovírus recombinantes (vAcAPDENV 1-4 e vAcAPZIKV) em microscópio de luz (Axiovert 100, Zeiss) após 72 h.p.i. Em **A**, células não infectadas (controle) Em **B**, infecção com AcMNPV; em **C**, células infectadas pelo vAc6xhis-AcPH; em **D**, células infectadas com vAcAPDENV1. **E**) vAcAPDENV2. **F**) vAcAPDENV3. **G**) vAcAPDENV4 e **H**) vAcAPZIKV.

O *Western Blot* do extrato total de células infectadas com os vírus recombinantes confirmou a expressão de proteínas de aproximadamente 36 kDa (Figura 36, A e B), correspondentes aos peptídeos de NS1 fusionados a poliedrina de AcMNPV, sendo compatíveis com os tamanhos esperados das proteínas fusionadas, além de confirmar a especificidade do anticorpo monoclonal anti-his de camundongo.

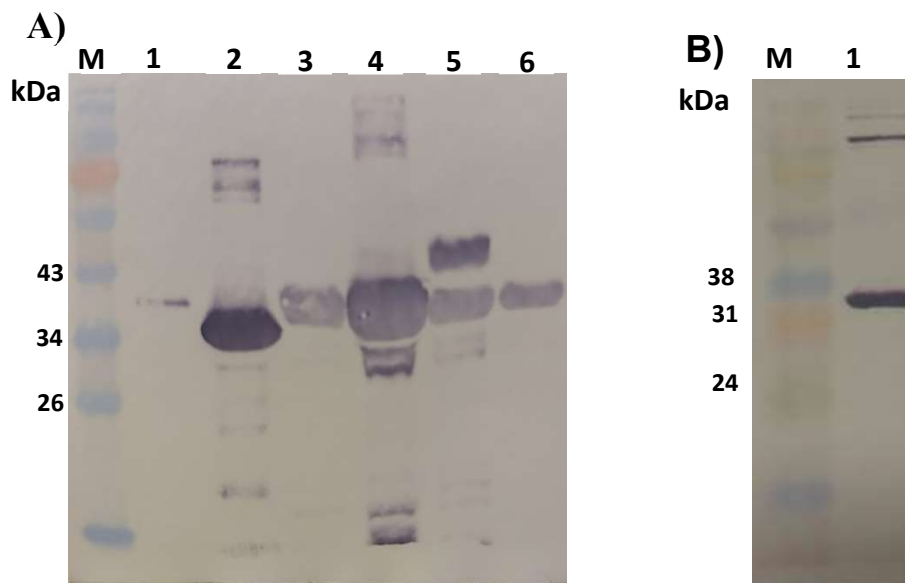


Figura 36. Confirmação da expressão das proteínas recombinantes por *Western blot*. Em **A e B**, membrana de nitrocelulose contendo extrato de células infectadas com os vírus recombinantes contendo os genes dos peptídeos de NS1 após 72 h.p.i mostrando a marcação do anti-soro monoclonal de camundongo anti cauda de histidina (anti-his). **M**) Marcador de massa molecular Prestained Protein Ladder (Promega). Em **A**, poço 1, extrato de células infectadas pelo AcMNPV selvagem; poço 2, extrato de células infectadas pelo vAc6xhis-AcPH; poço 3, extrato de células infectadas pelo vAcAPDENV1; poço 4, extrato de células infectadas pelo vAcAPDENV2; poço 5, extrato de células infectadas pelo vAcAPDENV3 e poço 6, extrato de células infectadas pelo vAcAPDENV4. E em **B**, extrato de células infectadas pela vAcAPZIKV.

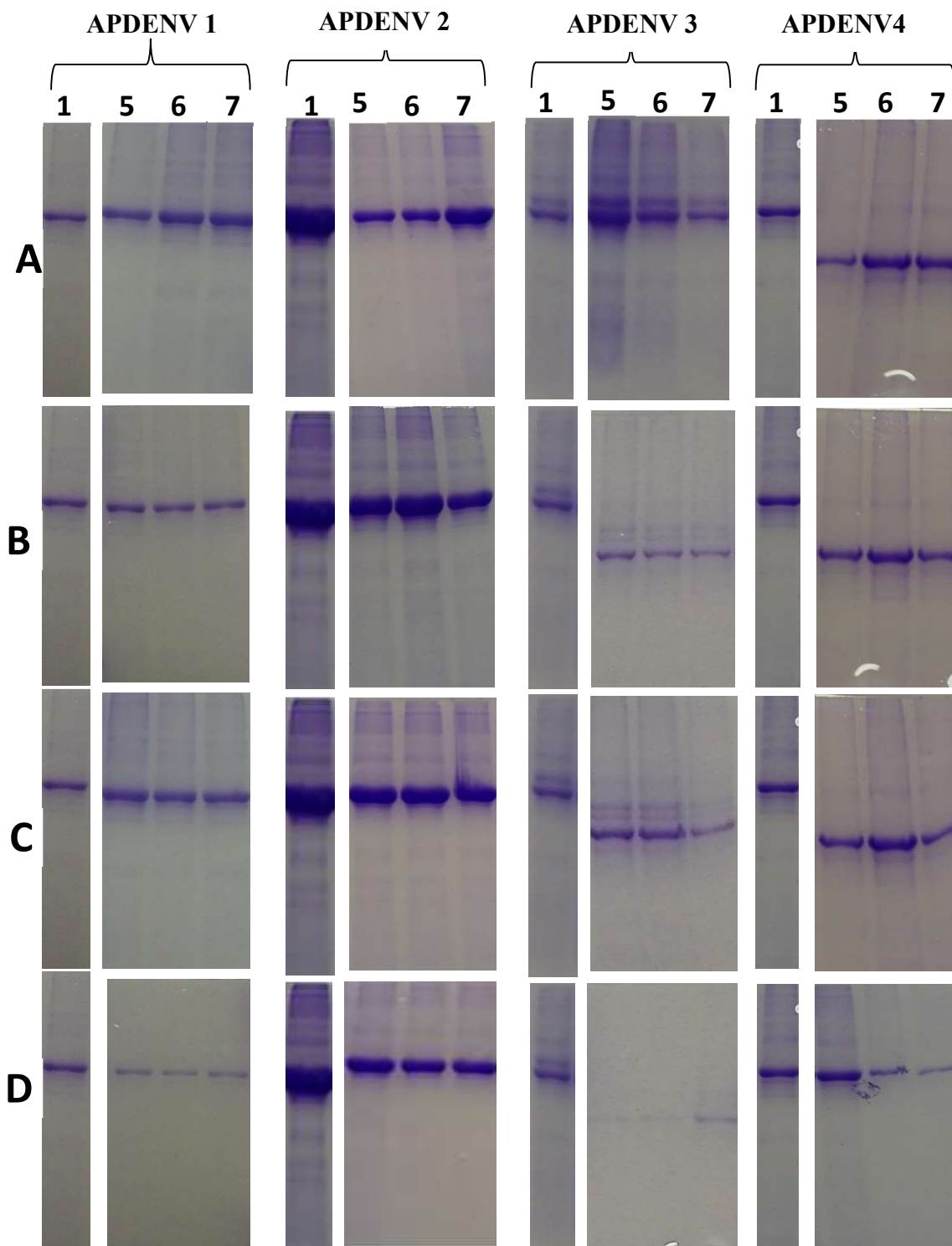


Figura 37. Eletroforese de gel SDS PAGE 12% da purificação das proteínas dos peptídeos de NS1 APDENV 1-4 usando diferentes detergentes. Em **A**, estão as proteínas que receberam 3 lavagens de Triton em diferentes concentrações. **1)** Controles APDENV1, APDENV2, APDENV3 e APDENV4 (não purificados); **5)** Triton 1%; **6)** Triton 2,5% e **7)** Triton 5%. Em **B**, proteínas que receberam 3 lavagens de Tween 20. **1)** Controles APDENV1, APDENV2, APDENV3 e APDENV4 (não purificados) **5)** Tween 20 1%; **6)** Tween 20 2,5% e **7)** Tween 20 5%. Em **C**, proteínas que receberam 3 lavagens de Nonidet. **1)** Controles APDENV1, APDENV2, APDENV3 e APDENV4 (não purificados); **5)** Nonidet 1%; **6)** Nonidet 2,5% e **7)** Nonidet 5%. Em **D**, proteínas que foram lavadas 2 vezes com SDS. **1)** Controles APDENV1, APDENV2, APDENV3 e APDENV4 (não purificados) **5)** SDS 0,1%; **6)** SDS 0,25% e **7)** SDS 0,5%. Após todas receberam uma lavagem com NaCl 0,5M, 114 foram centrifugadas e ressuspensas em PBS1x para armazenamento.

4.6. Purificação das proteínas recombinantes com diferentes detergente

Para averiguar qual seria a melhor estratégia a adotar na purificação destes 4 peptídeos, foi submetido os mesmos a lavagens com diferentes detergentes em concentrações variadas. Foi possível observar na (Figura 37.) que o Tween 20 5% se mostrou mais eficaz nas lavagens de todas as proteínas APDENV 1-4. Diante disso, para confirmar o resultado foi realizada uma eletroforese de gel SDS PAGE 12% com novas amostras de proteínas seguindo o protocolo descrito no item 3.9. Na (Figura 38, A) foi constatado que o Tween 20 5% obteve o melhor resultado de purificação com todos os peptídeos de DENV 1-4. Diante disso, este protocolo descrito no item 3.9 foi estabelecido para purificação das demais proteínas recombinantes conforme (Figura 38, B) do peptídeo de NS1 de APZIKV purificado com Tween 20 5%.

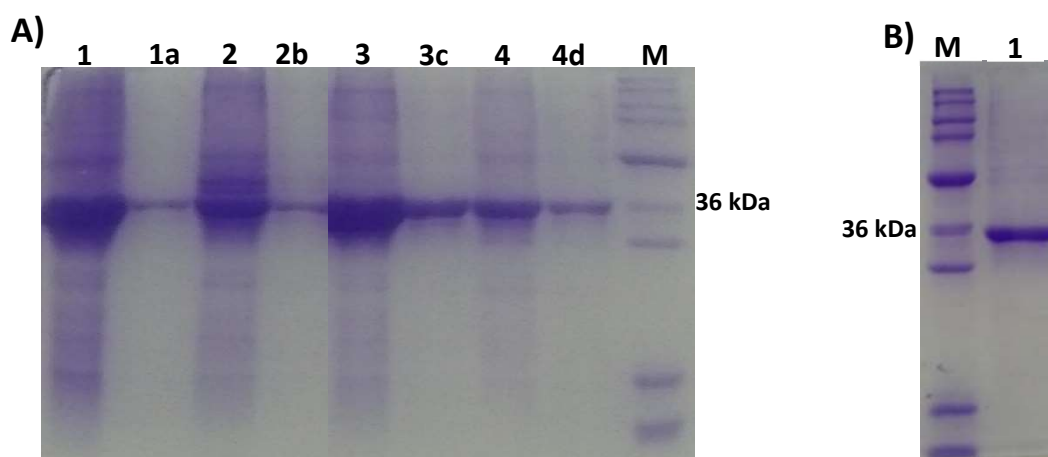


Figura 38. Eletroforese de gel de SDS PAGE 12% de proteínas purificadas de peptídeos APDENV 1-4 e APZIKV com Tween 20 5%. Em A, temos proteínas de DENV não purificadas e purificadas. **M)** Marcador de massa molecular (Promega); **1)** Controle APDENV4 (não purificado); **1a)** APDENV4 purificado; **2)** Controle APDENV3; **2b)** APDENV3 purificado; **3)** Controle APDENV2 e **3c)** APDENV2 purificado; **4)** Controle APDENV1; **4d)** APDENV1 purificado. E em B, apenas proteína de ZIKV purificada. **M)** Marcador de massa molecular (Promega); **1)** proteína APZIKV purificada.

4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na análise dos cristais proteicos após purificação foi observado que por mais que estas proteínas possuam a mesma massa molecular, cada construção apresenta uma morfologia e um tamanho de cristal diferente. Os cristais de APDENV3 são notavelmente menores que os demais construtos APDENV1, APDENV2, APDENV4 e APZIKV. Enquanto o 6xhis-AcPH apresentou a estrutura esperada (forma cúbica) (Figura 39.).

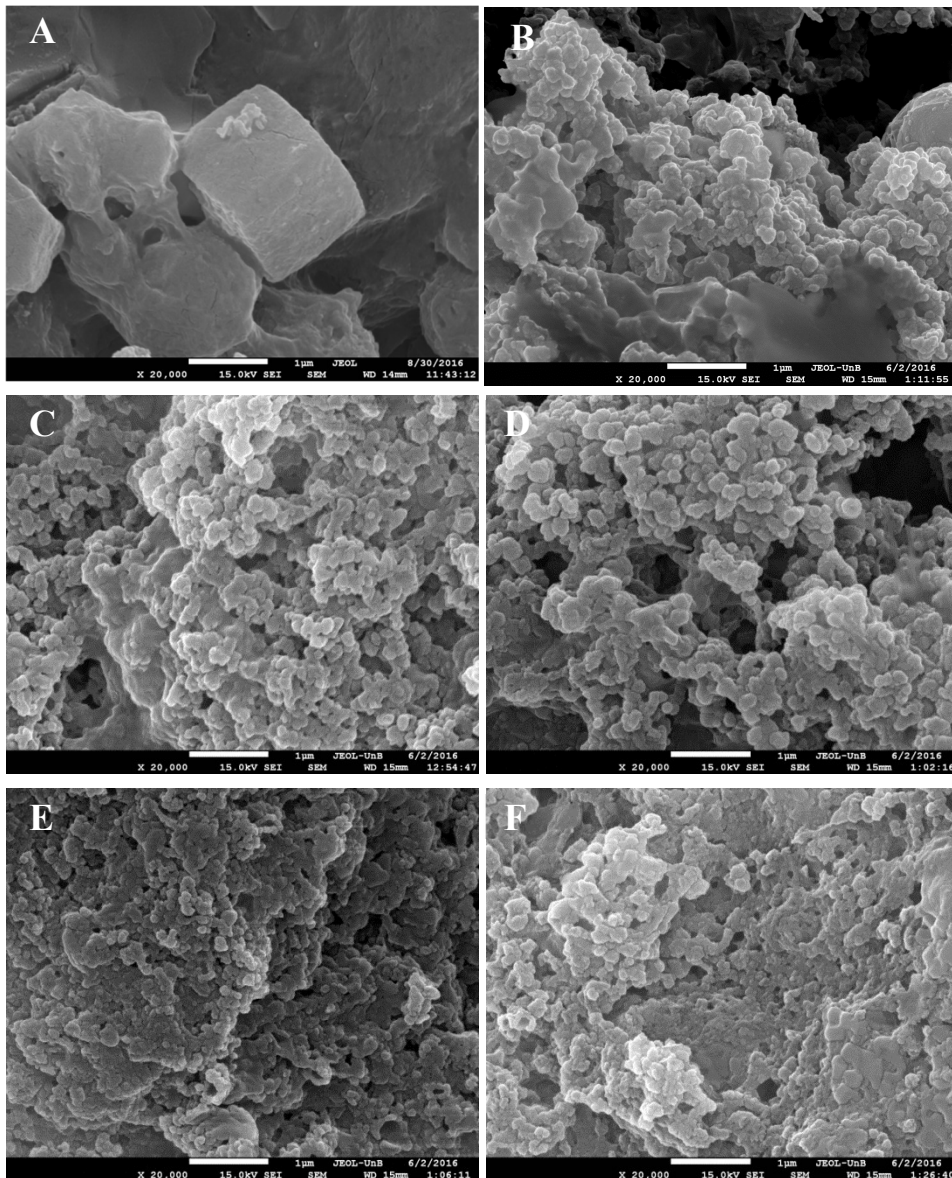


Figura 39. Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos corpos de oclusão derivados das fusões dos peptídeos APDENV 1-4 e APZIKV com a proteína poliedrina. Em A) poliedros de pFASTamino; B) cristais de APZIKV; C) APDENV1; D) APDENV2; E) APDENV3; F) APDENV4. Barra de referência - 1µm.

4.8. ELISA Indireto

Para o desenvolvimento de ELISA indireto visando a diagnosticar infecções causadas por DENV, utilizamos a proteína NS1 recombinante (NS1 de APDENV 1-4) como antígeno. Este experimento serviu como um piloto para realização de novos testes e este teve como objetivo verificar a sensibilidade isoladamente dos peptídeos de DENV 1-4 frente aos soros contendo DENVs dos quatro sorotipos, previamente diagnosticados por RT-PCR e/ou isolamento viral. Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 5 µg de cada peptídeo construído APDENV 1-4. Soros de pacientes com diferentes sorotipos de DENVs foram adicionados, representando um total de 188 amostras, dentre elas 47 de 48 amostras foram positivas para DENV1, 43 de 46 amostras para DENV2, 47 de 47 para DENV3 e 42 de 47 para DENV4.

E através da figura 41 é possível avaliar através da mistura dos antígenos de DENV 1 ao 4, a eficiência dos peptídeos construídos frente aos soros testados.

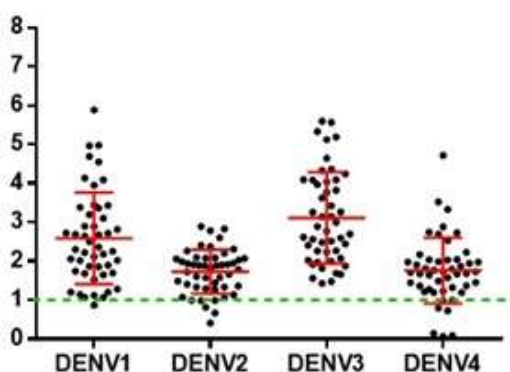


Figura 41. Análise de ELISA indireto dos peptídeos APDENV 1-4 isoladamente. Para desenvolvimento deste teste placas de 96 poços foram sensibilizadas com os peptídeos de NS1 construídos de DENV – 1 ao 4. Eixo Y – absorvância obtida com OD 405nm. Eixo X - soros de pacientes infectados com diferentes sorotipos de dengue. Os pontos pretos (•) que estão na figura representam o número de pacientes testados de cada sorotipo. Pontos abaixo do *cut-off* = 0,1 são soros de pacientes que não reagiram.

5. DISCUSSÃO

Os vírus Dengue, Zika, febre amarela e outros *Flavivirus*, causam doenças que, na fase inicial, possuem sintomatologia semelhante. Além disso, são transmitidos pelo mesmo mosquito vetor, o *A. aegypti*, que apresenta grande dispersão mundial. Neste contexto, devido a co-circulação desses vírus e a dificuldade de controle do vetor, a disposição de métodos de diagnóstico em humanos e o monitoramento viral e controle epidemiológico do vetor com detecção precoce e específica torna-se ainda mais necessária.

Além disso, uma das razões do diagnóstico desses vírus ainda ser muito precário, principalmente em regiões endêmicas, e por mais que ocorra aumento no número de casos a cada ano, o teste disponibilizado na rede pública de saúde bem como os demais testes disponibilizados na rede privada não possui sensibilidade suficiente nos primeiros sete dias de infecção, gerando resultados falso-negativos o que podem levar a tratamentos inadequados e evolução da doença, podendo levar à morte (Prado, 2015). Em relação à Dengue, temos que considerar que alguns sorotipos e ou genótipos podem apresentar diferenças na virulência e alta variabilidade genética, levando a manifestações clínicas diversas. Logo, existem limitações relacionadas ao diagnóstico clínico da doença, tratamento e desenvolvimento de vacinas efetivas, devido às dificuldades de diferenciar as manifestações clínicas da dengue das demais flaviviroses (Halstead, 2013).

Desta forma, a detecção direta do vírus depende do isolamento viral, da detecção de antígenos virais ou RNA em macerado de mosquitos, soro ou tecidos, ou da detecção indireta por avaliação de anticorpos específicos no soro dos pacientes. Os métodos diretos possuem alta sensibilidade e rapidez. Porém, são metodologias caras, que necessitam de treinamento específico, dependem da integridade da amostra e podem não prover diagnóstico rápido. Já os métodos sorológicos são de fácil execução, mas apresentam limitações: dependem do fim do período da resposta imunológica para que o diagnóstico seja concluído e apresentam sensibilidade diminuída em relação à possibilidade de identificação do sorotipo infectante, já que ocorrem reações cruzadas entre os diferentes vírus dos gêneros *Flavivirus*.

Em meio as várias técnicas sorológicas, os métodos de inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), teste de neutralização (TN), teste de amplificação de DNA (NAATs) e o MAC ELISA são os mais utilizados (Brasil, 2017). Entretanto, as três primeiras técnicas exigem coleta de amostras pareadas e, além do mais, exibem alta reatividade cruzada, o que impede a especificidade do diagnóstico, sendo assim, os testes mais utilizados é o NAATs

e o MAC ELISA ou de captura do antígeno viral NS1 (Gubler, 1998; Brasil, 2017). O NAATs pode distinguir o vírus específico. No entanto, devido a alta sensibilidade e especificidade deste método pode ocorrer resultados falso-positivos e falso-negativos (Santiago *et al.*, 2018) Já o MAC ELISA apresenta informações adicionais, porém a interpretação dos resultados frente a reação cruzada é complicada e é difícil determinar o tempo de infecção principalmente nos casos de zika que envolve mulheres grávidas, onde não é possível saber se a infecção foi antes ou durante a gravidez (CDC, 2019). O método de captura do antígeno viral NS1 é promissor visto que a proteína NS1 pode ser detectada em níveis altos no soro de pacientes, na urina, saliva e nos casos de suspeita de zika no líquido amniótico, sêmen e leite materno, com a mesma frequência que o RNA viral, ou seja, 2 dias antes da primeira semana de infecção (Sharp *et al.*, 2019).

Para os pacientes atendidos em emergências de centros de saúde tem se empregado o teste rápido para detecção simultânea de anticorpos IgM, IgG e antígeno NS1 (Dengue Duo Dengue Ag NS1 +Dengue IgG/IgM) (Oliveira *et al.*, 2011; Brasil, 2018). Este método molecular baseia-se na detecção do RNA viral a partir do soro do paciente suspeito durante o período virêmico, de forma que o diagnóstico molecular de infecções por DENV utiliza a Transcrição Reversa, seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) e permite classificar os sorotipos de DENV ao utilizar os iniciadores específicos das sequências genômicas de cada sorotipo viral (Oliveira *et al.*, 2011). Ainda, temos a abordagem com citometro de fluxo de fluorescência que permite quantificar células mononucleares de sangue periférico infectado por DENV e assim pode monitorar a atividade viral e medir a carga viral em estudos de patogênese. No entanto, essa técnica depende dos estágios da doença e ela ainda não foi validada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (Barreira *et al.*, 2018).

Como há várias formas de detecção e ausência de um único teste diagnóstico que seja considerado como o padrão de referência, a análise da acurácia de um novo teste diagnóstico para dengue e zika é afetada. Portanto, o desenvolvimento de um sistema de diagnose de anticorpos anti-NS1 é uma demanda importante. Desta forma, este trabalho se dispôs a desenvolver um sistema de diagnóstico baseado na expressão da proteína recombinante NS1 utilizando o sistema BEVS. Os peptídeos imunogênicos de NS1 de dengue (APDENV 1; APDENV2; APDENV3 e APDENV4) e APZIKV foram fusionados a poliedrina do baculovírus AcMNPV pelo sistema BEVS e os peptídeos de DENV dos diferentes sorotipos foram submetidos a realização de testes ELISA indireto para captura de anti-NS1 a partir do antígeno imunogênico. O peptídeo de ZIKV foi expresso, mas não foi utilizado no teste de ELISA neste

trabalho. Devido à falta de soros de pacientes sabidamente infectados por ZIKV, e a obtenção desse peptídeo após os testes de ELISA com soros de pacientes infectados por DENV, ainda não utilizamos essa proteína recombinante em testes sorológicos. Entretanto, pretendemos utilizá-la em trabalhos futuros.

A região de NS1 de DENV que serviu de base para a construção dos peptídeos imunogênicos foi baseada nos estudos de Mason *et al.* (1990) que detectaram múltiplos determinantes antigênicos no segmento de NS1 de DENV-1 (aminoácidos 57 a 126) e testou anticorpos monoclonais previamente construídos pelos autores contra diferentes regiões de NS1 de DENV-1.

A utilização de anticorpos monoclonais contra epítomos específicos tem se tornado uma alternativa viável para a inclusão em kits diagnósticos que utilizam como antígeno partículas virais ou proteínas recombinantes. Diversos clones produtores de anticorpos anti-dengue já foram obtidos e caracterizados por imunização de animais (Falconar; Young; Miles, 1994).

Muitos dos anticorpos grupo-específicos para dengue são dirigidos tanto contra a proteína “E” quanto contra proteína “NS1” (Chen *et al.*, 2007). Além disso, várias estratégias têm sido desenhadas para produzir anticorpos monoclonais capazes de reconhecer antígenos contendo regiões conservadas de diferentes sorotipos do DENV e ainda os diferentes vírus de forma simultânea (Clementi *et al.*, 2012). O fato é que a utilização de anticorpos monoclonais para confecção de kits para o diagnóstico da dengue pode levar a um aumento da especificidade da reação, conseqüentemente melhorando a qualidade de kits destinados para a detecção desta doença.

O sistema BEVS vem sendo amplamente utilizado para expressão de diversas proteínas clinicamente importantes que atuam como antígenos em diagnóstico (Ahmad *et al.*, 1993; Chaves, 2016; Joshua *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Morii *et al.*, 1998; Quiao *et al.*, 2004; Saunier *et al.*, 2003; Da Silva, 2016).

Algumas proteínas de DENV expressas usando BEVS e avaliadas quanto ao uso potencial em diagnósticos foram descritas na literatura como a proteína de envelope (Henchal; Putnak, 1990; Zhang *et al.*, 1988), a NS3 e pré-M (Stephenson, 2005) mas estudos de Eckels *et al.* (1994); Feighny *et al.* (1992) confirmam que a melhor candidata para produção de antígenos com fins diagnósticos é a proteína NS1. Esta proteína por apresentar um alto potencial antigênico e imunogênico (Back; Lundkvist, 2013) vem sendo constantemente estudada (Wattersson; Mod Hiran; Young, 2016) e utilizada no desenvolvimento de kits diagnóstico (Prado, 2015).

O uso da proteína NS1, já foi demonstrado em teste ELISA e revelou alta sensibilidade para detectar NS1 durante uma primeira infecção, acima de 90% e durante uma segunda infecção a sensibilidade é de 60-80%. Portanto, a proteína NS1 poderia auxiliar na detecção de um paciente com dengue na fase ainda inicial da doença. Essa proteína também poderia ajudar a identificar quais pacientes possuem chances de desenvolver a febre hemorrágica visto que durante esse quadro os níveis de NS1 são consideravelmente mais altos, por ser excretada pelas células infectadas e por conseguir se ligar a membrana de células que não estão infectadas, sendo assim, apontada como a possível causadora do extravasamento capilar, devido ao dano às células epiteliais já que estas se tornam alvos de anticorpos anti-NS1 quando a proteína está ligada à membrana, o que causa ativação do sistema complemento (Martina; Koraka; Osterhaus, 2008).

Acredita-se, também, que a proteína NS1 secretada tenha capacidade de ativar diretamente o sistema complemento ao se ligar a fatores deste que estejam presentes do plasma sanguíneo (Martina; Koraka; Osterhaus, 2008). Os anticorpos produzidos são especialmente contra as proteínas estruturais. Porém, como a proteína NS1 é uma das primeiras proteínas a ser secretada no plasma sanguíneo, experimentos já demonstraram que ocorre a produção de anticorpos anti-NS1 da dengue contra grupos específicos e epítomos tipo-específicos (Wahala; Aravinda, 2011). Através do teste ELISA descobriu-se que a proteína NS1 é responsável por estimular uma alta quantidade de IL-6 e de TNF- α durante a infecção pelo DENV. Essa produção de citocinas pode ser um indicativo da contribuição da NS1 na patologia da dengue. Devido a suas diferentes ações na célula, diversas pesquisas têm como alvo a proteína NS1 para o desenvolvimento de vacinas, terapia com drogas antivirais e diagnóstico precoce e diferencial da doença (Amorim *et al.*, 2014). A combinação da detecção do antígeno NS1 circulante e dos anticorpos anti-NS1 para melhorar a sensibilidade e a especificidade dos kits diagnósticos é uma alternativa que tem sido proposta e seguida por diversos pesquisadores (Pal *et al.*, 2014). Associando esses dois elementos torna possível observar infecções secundárias que não aparecem nos testes que já existem, devido a formação de complexo antígeno-anticorpo gerado pelos anticorpos anti-NS1 da primeira infecção, que não permite a detecção de uma outra infecção posteriormente (Martina; Koraka; Osterhaus, 2009).

Os vírus recombinantes construídos neste trabalho (vAcAPDENV1; vAcAPDENV2; vAcAPDENV3; vAcAPDENV4 e vAcAPZIKV) foram confirmados por PCR e a expressão das proteínas recombinantes em células de inseto foi visualizada pela microscopia de luz e *Western blot*. Após infecção de células Tn5B com os vírus recombinantes (48 h. p. i.) observamos

alterações morfológicas nas células infectadas como hipertrofia nuclear e presença de corpos de oclusão protéicos semelhantes a cristais em microscópio de luz. A grande vantagem em se expressar proteínas recombinantes, fusionadas à poliedrina de baculovírus em células de inseto pelo sistema de baculovírus é a similaridade destas proteínas com a proteína nativa, expressa *in vivo*, o que pode facilitar a purificação e assim proporcionar o desenvolvimento de testes mais rápidos e principalmente mais específicos de diagnóstico (Barros, 2007).

A análise eletroforética mostrou a presença de polipeptídeos de 36 kDa (AP-NS1 fusionada à poliedrina), confirmando a fusão destes recombinantes à poliedrina.

Uma vez que o trabalho propôs desenvolver uma metodologia eficiente para produção de insumos para detecção da infecção pelo DENV, diferentes metodologias de purificação das proteínas recombinantes foram avaliadas, mas apenas a purificação com diferentes detergentes nos proporcionou menos perda das proteínas e maior purificação. Estudos de Domingues, (2013) testou várias formas de purificação como: a purificação por gradiente de sacarose de 40-65% (O'Reilly; Miller; Luckow, 1992) para purificação de poliedros selvagens; o '*Ion Exchange Chromatography*' utilizando o cromatógrafo líquido – FPLC AKTA (Ge Healthcare) e coluna de sepharose '*Q-Sepharose SP-XL anion column*' (GE Healthcare); a coluna de níquel '*MagneHis™ Ni-Particles*' (Promega); e ainda, o gradiente de sacarose 40-80% (Ardisson-Araújo, 2012) e com nenhuma delas obteve os padrões de purificação desejáveis. Assim, para evitar perdas na quantidade de proteínas recombinantes durante o procedimento de purificação, realizamos o teste de purificação com apenas lavagem do extrato celular com diferentes detergentes. O detergente Tween 20 5% mostrou-se mais eficiente na purificação das proteínas recombinantes, enquanto o uso dos outros detergentes testados como Triton, SDS e Nonidet resultou em perda significativa das proteínas recombinantes.

Como os peptídeos de NS1 foram devidamente purificados (APDENV 1; APDENV2; APDENV3; APDENV4) estes foram submetidos a detecção de anticorpos pela sensibilização de placas com estes antígenos através do teste de ELISA indireto. Com base no trabalho de Domingues, (2013), utilizando a mesma metodologia empregada, a autora obteve resultados importantes com os peptídeos dos sorotipos DENV 2, 3 e 4 frente a alta sensibilidade ou positividade destes de forma isolada na placa, e a reatividade cruzada com outros arbovírus como febre amarela, sarampo e rubéola. Ainda neste trabalho, o peptídeo APNS1-DENV2 obteve 100% (36/36) de sensibilidade nas três placas com 36 amostras analisadas (24 soros de DENV2, e seis de DENV3 e outros 6 de DENV4, além de 6 soros negativos, 6 soros normais e 6 com PBS 1x) , e os peptídeos APNS1-DENV3 e APNS1-DENV4 contaram com o mesmo

número de soros e obtiveram 97,2% (35/36) de sensibilidade na mesma amostragem. Os testes de reatividade cruzada dos peptídeos isolados e com a mistura dos mesmos frente aos soros de pacientes com FA, rubéola e sarampo (12 soros de cada), apresentaram absorvância elevada em alguns pontos dos controles negativos de todas as placas testadas o que elevou o *cut-off*, alterando desta forma o resultado que foi favorável, onde não houve reatividade cruzada entre as amostras testadas.

Diante destes resultados apresentados acima pelo trabalho de Domingues (2013), foi realizado um teste piloto no intuito de enriquecer esses dados e neste procedimento foi verificado a sensibilidade dos peptídeos dos quatro sorotipos de DENV construídos frente ao soro de pacientes infectados, de forma individual, previamente confirmados por RT-PCR ou isolamento viral. Para isso, placas foram sensibilizadas com os peptídeos construídos APDENV 1-4 separadamente. Soros de pacientes com diferentes sorotipos de DENVs foram adicionados, representando um total de 188 amostras, dentre elas 47 de 48 amostras foram positivas para DENV1, 43 de 46 amostras para DENV2, 47 de 47 para DENV3 e 42 de 47 para DENV4. Estes valores confirmam a eficiência da produção dos antígenos e do método que foi baseado na captura de anticorpos anti-NS1. Por falta de amostras de dengue, os testes não puderam ser repetidos, mas posteriormente, com a existência de novas amostras tanto o teste de sensibilidade de forma isolada dos peptídeos como o de mistura destes e o de reatividade cruzada com outras doenças puderam serem refeitos e padronizados com os controles necessários para assegurar a confiabilidade do teste.

Este novo método de detecção proposto apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais, e acredita-se que apresentará maior sensibilidade. Mas ainda há muitos testes para serem realizados. Pode se tornar uma estratégia inovadora que possibilitará a detecção da doença nos primeiros dias após a infecção evitando assim o avanço da doença e atingir uma maior parcela da população, provendo uma diagnose mais eficiente, resultando em um tratamento mais adequado, e auxiliando, desta forma, a prevenção da Dengue, gerando melhorias e favorecendo a saúde pública no Brasil.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As flaviviroses, ano após ano, configuram-se como um grande problema de saúde pública e mesmo com um grande investimento no combate ao vetor e em pesquisas sobre esses vírus as dificuldades para o enfrentamento dessas doenças persiste. Este trabalho teve dois objetivos, o desenvolvimento de insumos para diagnóstico da infecção pelo DENV e ZIKV; e o desenvolvimento de antígenos vacinais para vacinas contra raiva e FA. O enfrentamento de arboviroses emergentes exige políticas e intervenções de amplo espectro, envolvendo vários setores da sociedade, não somente a área da saúde. Observa-se o estabelecimento definitivo do *Aedes* nas Américas, associado às mudanças climáticas, desmatamentos, urbanização desorganizada, ausência de água e saneamento básico, deslocamentos populacionais. Esses fatores definem os caminhos das doenças, influenciados pela pressão da mutação viral e de adaptações genéticas dos vírus a hospedeiros, vetores e novos ambientes.

Mesmo diante de dificuldades na atuação sobre fatores socioeconômicos e ambientais, a área da saúde tem responsabilidades, como investimentos na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de infecções. O desenvolvimento de kits diagnósticos e antígenos vacinais tem sido um desafio para vários grupos de pesquisa no Brasil e no mundo, considerando sua viabilidade já constatada para vários *Flavivírus*. Investimentos na qualificação das ações de vigilância epidemiológica, virológica, vetorial e de epizootias são medidas de extrema importância.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; HEMMI, H.; MIYAMOTO, H.; MORIISHI, K.; TAMURA, S.; TAKAKU, H.; AKIRA, S.; MATSUURA, Y. Involvement of the Toll-Like Receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. **Journal of Virology**, p. 2847-2858, 2005.

ABE, T.; KANAME, Y.; WEN, X.; TANI, H.; MORIISHI, K.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O.; ISHII, K. J.; KAWAI, T.; AKIRA, S.; MATSUURA, Y. Baculovirus induces type I interferon production through Toll-Like receptor-dependent and – independent pathways in a cell-type-specific manner. **Journal of Virology**, p. 7629-7640, 2009.

ADAMS, J. R.; McCLINTOCK, J. T. Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. Part 1. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Insects. In: **Atlas of Invertebrate Viruses** (Adams JR and Bonami JR, eds.). CRC Press, Florida, p. 89-180,1991.

AHMAD, S.; BASSIRI, M.; BANERJEE, A. K.; YILMA, T. Immunological characterization of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant baculovirus in *Spodoptera exigua* larva: use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. **Virology**, v. 192, p. 207-216, 1993.

AMORIM, J. H. ALVES, R. P.; BOSCARDIN, S. B.; FERREIRA, L. C. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. **Virus Res.** v. 181, p. 181:53-60, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Vacina dengue: esclarecimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXRpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201>. Acesso em 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Testes sorológicos vírus zika. Disponível em: <https://sbmicrobiologia.org.br/anvisa-aprova-testes-sorologicos-para-detectar-o-zika-virus/> Acesso em 2016.

ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; MELO, F. L.; CLEM, R. J.; WOLFF, J. L. C.; RIBEIRO, B. M. A betabaculovirus-encoded *gp64* homolog is a functional envelope fusion protein. **Journal of Virology (Print)**, v. 90, p. 02491-15, 2015.

ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; ROCHA, J. R.; COSTA, M. H.; BOCCA, A. L.; DUSI, A. N.; RESENDE, R. O.; RIBEIRO, B. M. A baculovirus-mediated strategy for full-length plant virus coat protein expression and purification. **Virology Journal**, v. 10, p. 262, 2012.

ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; MORGADO, F. S.; SCHWARTZ, E. F.; CORZO, G.; RIBEIRO, B. M. A new theraphosid Spider Toxin Causes Early Insect Cell Death by Necrosis When Expressed In Vitro during Recombinant Baculovirus Infection. **Plos One**, v. 8, p. 157-467, 2013.

AVIRUTNAN, P.; PUNYADEE, N.; NOISAKRAN, S.; KOMOLTRI, C.; THIEMMECA, S.; AUETHAVORNANAN, K.; JAIRUNGSRI A.; KANLAYA, R.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; PUTTIKHUNT, C.; PATTANAKITSAKUL, S. N.; YENCHITSOMANUS, P. T.; MONGKOLSAPAYA, J.; KASINRERK, W.; SITTISOMBUT, N.; HUSMANN, M.; BLETTNER, M.; VASANAWATHANA, S.; BHAKDI, S.; MALASIT, P. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis**, v. 193, p. 1078-88, 2006.

BÄCK A.T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses - an overview. **Infect ecol epidemiol.** v. 3, p. 1–21, 2013.

BAGGIO, M. P. D.; RIBEIRO, L. F. C.; VESSARO-SILVA, S. A.; BRANCALHÃO, R. M. C. Bombyx mori pylorus infection by alphabaculovirus. **Genetics and Molecular Research.** p. 3-13, 2014.

BAKKER, A. B.; MARISSSEN, W.; GOUDSMIT, J. Antigenic peptides of rabies virus and uses thereof. Google Patents, 2006.

BARRET, A. D. T. The reemergence of yellow fever. **Science**, V. 361, P. 847-848, 2018.

BARROS, M. C. DO E. S. **Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o sistema Baculovírus de expressão.** Dissertação da Patologia Molecular da Universidade de Brasília – UNB, 2007.

BARROS, M. C. E. **Atividade de baculovírus selvagens em camundongos *in vivo* e *in vitro* e Expressão da proteína do envelope do vírus da Febre Amarela (YFE) e da glicoproteína do vírus da Raiva (RVGP) em células de inseto.** Tese de Doutorado, Universidade de Brasília - UNB, 2011.

BARZON, L.; TREVISAN, M.; SINIGAGLIA, A.; LAVEZZO, E.; PALÙ, G. Zika vírus: from pathogenesis to disease control. **Microbiol**, v. 363, 2016.

BECK, N. B.; SIDHU, J. S.; OMIECINSKI, C. J. Baculovirus vectors repress Phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes. **Gene Therapy**, v. 7, p. 1274-1283, 2000.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504-7, 2013.

BLACKSELL, S.D.; JARMAN, R. G.; BAILEY, M. S.; ANGANUCHITCHARNCHAI, A.; JENJAROEN, K.; GIBBONS, R. V. Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: the need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. **Clinical and vaccine immunology**, v. 18, p. 2095-101, 2011.

BLISSARD, G. W. **Baculovirus-insect cell interactions**. Cytotechnology, v. 20, p. 73-93, 1996.

BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. **Baculovirus diversity and molecular biology**. Annual Review of Entomology, v. 35, p. 127-55, 1990.

BOCCA, A. L.; BARROS, M. C. E. S.; MARTINS, G. K. M.; DE ARAÚJO, A. C. O.; SOUZA, M. J.; RIBEIRO, A. M.; FIGUEIREDO F.; RIBEIRO, B. M. Immunological effects of *Anticarsia gemmatalis* multiplenucleopolyhedrovirus (AgMNPV) by stimulation of mice in vivo and in vitro. **Virus Research**, v. 176, p. 119-127, 2013.

BRACONI, C. T. **Proteoma do baculovirus *Anticarsia gemmatalis* múltiplo nucleopoliedrovirus em linhagens celulares distintas e comparação da proteína de envelope GP64 em variantes geográficos**. Tese de Doutorado em Microbiologia pela Universidade de São Paulo, 2013.

BRANCALHÃO, R. M. C.; TORQUATO, E. F. B.; CASTRO, M. E. B. Identificação de um isolado de *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus* (BmMNPV) no Estado do Paraná, Brasil. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 33, p. 6-13, 2002.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico da Raiva. 2015.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Ciclo de transmissão do mosquito *A. aegypti*, 2018.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico da febre amarela. 2019.

BOS, S.; GADEA, G.; DESPRES, P. Dengue: a growing threat requiring vaccine development for disease prevention. **Pathogens and Global Health**, v. 112, p. 294-305, 2018.

BRINTON, M. A. The molecular biology of West Nile virus: A new invader of the western hemisphere. **Annual Review of Microbiology**. v. 56, p. 371–402, 2002.

BURAND, J. P.; SUMMERS, M. D.; SMITH, G. E. Transfection with baculovirus DNA. **Virology**, v. 101, p. 286-290, 1980.

BURRATTINI, M. N.; LOPEZ, L. F.; COUTINHO, F. A. B.; SIQUEIRA JR, J. B.; HONSANI, S.; SARTI, E.; MASSAD, E. Age and regional differences in clinical presentation and risk of hospitalization for dengue in Brazil, 2000-2014. **Clinics**, v. 71, p. 455–463, 2016.

CAI, K.; FENG, J.N.; WANG, Q.; LI, T.; SHI, J.; HOU, X.J.; GAO, X.; LIU, H.; TU, W.; XIAO, L.; WANG, H. Fine mapping and interaction analysis of a linear rabies virus neutralizing epitope. **Microbes Infect**, v.12, p. 948–955, 2010.

CAO-LORMEAU, V. M.; BLAKE, A.; MONS, S.; LASTÈRE, S.; ROCHE, C.; VANHOMWEGEN, J.; DUB, T.; BAUDOUIN, L.; TEISSIER, A.; LARRE, P.; VIAL, A. L.; DECAM, C.; CHOUMET, V.; HALSTEAD, S. K.; WILLISON, H. J.; MUSSET, L.; MANUGUERRA, J. C.; DESPRES, P.; FOURNIER, E.; MALLET, H. P.; MUSSO, D.; FONTANET, A.; NEIL, J. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet, Londres**, v. 387, p. 1531-1539, 2016.

CARRILLO-HERNANDEZ, RUIZ-SAENZ, J.; VILLAMIZAR, L. J.; GOMES-RANGEL, S. Y.; MARTINEZ-GUTIEREZ, M. Co-circulation and simultaneous coinfection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, p. 61, 2018.

CARNIELI, P.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M. L.; CASTILHO, J. G.; MACEDO, C. I.; MACHADO, L. M.; RANGEL, N.; DE CARVALHO, R. C.; DE CARVALHO, V. A.; MONTEBELLO L. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus research**, v. 120, p. 113-120, 2006.

CAVALCANTI, L. P.; VILAR, D.; SOUZA-SANTOS, R.; TEIXEIRA, M. G. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 132-4, 2011.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Morbidity and Mortality weekly report. Human rabies prevention**. United States, 2008.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Morbidity and Mortality weekly report. Fever yellow virus prevention**. United States, 2019.

CENNA, J. TAN, G. S.; PAPANERI, A. B.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNELL, M. J.; MCGETTIGAN, J. P. Immune modulating effect by a phosphoprotein-deleted rabies virus vaccine vector expressing two copies of the rabies virus glycoprotein gene. **Vaccine**, v. 26, p. 6405-6414, 2008.

CHA, H. J.; PHAM, M. Q.; RAO, G.; BENTLEY, W. E. Expression of green fluorescent protein in insect larvae and its application for heterologous protein production. **Biotechnol Bioeng**, v. 56, p. 239-47, 1997.

CHARLTON, K. The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 187, p. 95, 1994.

CHAVES, L. C. S. **Uso de baculovírus como ferramenta para produção de antígenos vacinais e “vírus like particles” (VLPS)**. Tese de Doutorado em Biologia Molecular da Universidade Federal de Brasília – UNB, 2016.

CHEN, Y. R.; ZHANG, S.; FEI, Z.; HASHIMOTO, Y.; XIANG, J. Z.; ZHANG, S.; BLISSARD, G. W. The transcriptome of the Baculovirus Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus in Trichoplusia ni Cells. **J. Virol.** v. 87, p. 6391–6405, 2013.

CHEN, Y. C; HUANG, H. N.; LIN, C. T.; CHEN, Y. F.; KING, C. C.; WU, H. C. Generation and characterization of monoclonal antibodies against dengue virus type 1 for epitope mapping

and serological detection by epitope-based peptide antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 404–411, 2007.

CHERNIN, L. R.; SWENDER, D.; HOSTOFFER, R. W.; Cracking the shell on egg-hypersensitive patients and egg-containing vaccines. **J. Am Osteopath Assoc**, v. 111, p. 5-6, 2011.

CLEAVELAND, S.; KAARE, M.; KNOBEL, D.; LAURENSEN, M.K. Canine vaccination – Providing broader benefits for disease control. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 43-50, 2006.

CLEMENTI, N.; MANCINI, N.; SOLFOROSI, L.; CASTELLI, M.; CLEMENTI, M.; BURIONI, R. Phage display-based strategies for cloning and optimization of monoclonal antibodies directed against human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8273–8292, 2012.

COCONI-LINARES, N.; ORTEGA-DÁVILA E.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, M.; GARCÍA-MACHORRO, J.; GARCÍA-CORDERO, J.; STEINMAN, R. M.; CEDILLO-BARRÓN, L.; GÓMEZ-LIM, M. A. Targeting of envelope domain III protein of DENV type 2 to DEC-205 receptor elicits neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**. V. 31, P. 2366-71, 2013.

COELHO, G. E.; BURATTINI, M. N.; TEIXEIRA, M. G.; COUTINHO, F. A. B.; MASSAD, E. Dynamics of the 2006/2007 dengue outbreak in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 535-9, 2008.

DA SILVA, L. A. **Expressão de antígenos virais fusionados a uma proteína formadora de corpos de oclusão de um vírus de inseto**. Tese de doutorado em Patologia Molecular da Universidade Federal de Brasília – UNB, 2016.

DATAL, N. G.; BENTLEY, W. E.; CHA, H. J. Facile monitoring of baculovirus infection for foreign protein expression under very late polyhedrin promoter using green fluorescent protein reporter under early-to-late promoter. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 27-30, 2005.

DEMENTO S. L.; SIEFERT, A. L.; BANDYOPADHYAY, A.; SHARP, F. A.; FAHMY, T. M.; Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. **Trends Biotechnol**, v. 29, p. 294-306, 2011.

DE PAULA, S.O.; FONSECA, BAL DA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Braz J Infect Dis**, v. 8, p. 390–8, 2004.

DETVISITSAKUN, C. BERRETTA, M. F.; LEHIY, C.; PASSARELLI, A.L. Stimulation of cell motility by a viral fibroblast growth factor homolog: proposal for a role in viral pathogenesis. **Virology**, v. 336, p. 308–317, 2005.

DIETZGEN, R.; CALISHER, C.; KURATH, G.; KUZMAN, I.; RODRIGUEZ, L.; STONE, D.; TESH, R.; TORDO, N.; WALKER, P.; WETZEL, T. Rhabdoviridae -Virus taxonomy. **Committee on Taxonomy of Viruses Elsevier**, p 654–681, 2012.

DIETZSCHOLD, B.; GORE, M.; MARCHADIER, D.; NIU, H.S.; BUNSCHOTEN, H.M.; OTVOS, L, JR.; WUNNER, W.H.; ERTL, H.C.; OSTERHAUS, A.D.; KOPROWSKI, H. Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. **Journal Virology**, v. 64, p. 3804–3809, 1990.

DOMINGUES, R. A.; **Desenvolvimento de um teste sorológico capaz de detectar anticorpos anti-NS1 de Dengue vírus**. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular da Universidade de Brasília – UNB, 2013.

ECKELS, K. H.; DUBOIS, D. R.; SUMMERS, P .L.; SCHLESINGER, J.J.; SHELLY, M.; COHEN, S.; ZHANG, Y. M.; LAI, C. J.; KURANE, I.; ROTHMAN, A. Immunization of monkeys with baculovirus-dengue type 4 recombinants containing envelope and nonstructural proteins: evidence of priming and partial protection. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 50, p. 472-78, 1994.

ELLIOTT, R. M.; WEBER, F. Bunyaviruses and the type I interferon system. **Viruses**, v. 1, p. 1003–1021, 2009.

ENGELHARD, E. K.; MORGAN-KAN, L.N.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 91, p. 3224–3227, 1994.

FAN, Q.; LI, S.; WANG, L.; ZHANG, B.; YE, B.; ZHAO, Z. The genome sequence of the multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*. **Virology**, v. 366, p. 304–315, 2007.

FAN, J.; LIU, Y.; XIE, X.; ZHANG, B.; YUAN, Z. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by flavivirus recombinant E protein domain III. **Virol Sin**, v. 28, p. 152-160, 2013.

FABER, M.; JIANWEI L. I.; KEAN, R. B.; HOOPER, D.C.; ALUGUPALLI, K. R.; DIETZSCHOLD, B. Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 11300-11305, 2009.

FALCONAR, A.; YOUNG, P.; MILES, M. J. A. Precise location of sequential dengue virus subcomplex and complex B cell epitopes on the nonstructural-1 glycoprotein. **The Lancet, Londres**, v. 137, p. 315-26, 1994.

FARES, R. C.; SOUZA, K. P.; ANEZ, G.; RIOS, M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **Biomed Res Int**. p. 321-873, 2015.

FARIA, N. R. AZEVEDO, R. D. S. D. S.; KRAEMER, M. U. G.; SOUZA, R.; CUNHA, M. S.; HILL, S. C.; THÉZÉ, J.; BONSALE, M. B.; BOWDEN, T. A.; RISSANEN, I.; ROCCO, I. M.; NOGUEIRA, J. S.; MAEDA, A. Y.; VASAMI, F. G. D. S.; MACEDO, F. L. L.; SUZUKI, A.; RODRIGUES, S. G.; CRUZ, A. C. R.; NUNES, B. T.; MEDEIROS, D. B. A.; RODRIGUES, D. S. G.; QUEIROZ, A. L. N.; DA SILVA, E. V. P.; HENRIQUES, D. F.; DA ROSA, E. S. T.; DE OLIVEIRA, C. S.; MARTINS, L. C.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, p. 345-349, 2018.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. New engle and journal. **Perspective**, v. 363, p. 1-3, 2016.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; MORAIS, N. B.; ARAÚJO, F. A.; DE MATTOS, C. A. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Diseases** v. 7, p. 1062, 2001.

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. The baculoviruses. Plenum Press, p. 33-60, 1997.

FEIGHNY, R.; BURROUS, J.; McCOWN, J.; HOKE, C.; PUTNAK, R. Purification of native dengue-2 viral proteins and the ability of purified proteins to protect mice. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 47, p. 405-12, 1992.

FIELDS, B. N.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. Fields Virology, fourth ed. 2007.

FINKE, S.; CONZELMANN, K. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. **Journal of Virology**, v. 22, p. 12074-12082, 2003.

FOGED, C. Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. **Ther Deliv**, v. 2, p. 1057-1077, 2011.

FONSECA, B. A. L.; FONSECA, S. N. S. Dengue virus infections. **Curr Opin Pediatr**, v. 14, p. 67-71, 2002.

FUWA, K.; KUBOTA, M.; KANNO, M.; MIYABAYASHI, H.; KAWABATA, K.; KANNO, K.; SHIMIZU, M. Mitochondrial disease as a cause of neonatal hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Case Reports in Pediatrics**, p. 157-8355, 2016.

GALLER, R.; PUGACHEV, K. V.; SANTOS, C. L.; OCRAN, S. W.; JABOR, A. V.; RODRIGUES, S. G.; MARCHEVSKY, R. S.; FREIRE, M. S.; ALMEIDA, L. F.; CRUZ, A. C. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. **Virology**, v. 290, p. 309-319, 2001.

GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W. H.; TUFFEREAU, C.; KNOSSOW, M.; GAUDIN, A. F. Y. Rabies virus glycoprotein is a trimer. **Virology**, v. 187, p. 627-632, 1992.

GEYSEN, H. M.; MELOEN, R. H.; BARTELING, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, p. 3998-4002, 1984.

GIRI, L.; FEISS, M. G.; BONNING, B. C.; MURHAMMER, D. W. Production of baculovirus defective interfering particles during serial passage is delayed by removing transposon target sites in fp25k. **Journal of General Virology**, v. 93, p. 389-399, 2012.

GOLDENBERG, M. M. Pharmaceutical approval update. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 38, p. 150-2, 2013.

GONÇALVES, A. J.; OLIVEIRA, E. R.; COSTA, S. M.; PAES, M. V.; SILVA, J. F.; AZEVEDO, A. S.; MANTUANO-BARRADAS, M.; NOGUEIRA, A. C.; ALMEIDA, C.

J.; ALVES, A. M. Cooperation between CD4⁺ T Cells and Humoral Immunity Is Critical for Protection against Dengue Using a DNA Vaccine Based on the NS1 Antigen. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, p. 42-77, 2015.

GRANADOS, R. R.; GUOXUM, L.; DERKSSEN, A. C. G.; MCKENNA, K. A. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 260-266, 1994.

GRONOWSKI, A. M.; HILBERT, D. M.; SHEEHAN, K. C. F.; GAROTTA, G.; SCHREIBER, R. D. Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. **Journal of Virology**, p. 9944-9951, 1999.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D.J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. **Tropical Medicine and Health**, p. S3-11, 2006.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. **Emerging Themes in Epidemiology**, v. 2, p. 1, 2005.

GUPTA, P. K. SHARMA, S.; WALUNJ, S. S.; CHATURVEDI, V. K.; RAUT, A. A.; PATIAL, S.; RAI, A.; PANDEY, K. D.; SAINI, M. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. **Veterinary microbiology**, v. 108, p. 207-214, 2005.

GUY, B.; SAVILLE, M.; LANG, J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Hum Vaccin**, v. 6, 2010.

HAASE, S.; SCIOCCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V. Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. **Viruses**, v. 7, p. 2230-67, 2015.

HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv Virus Res**, v. 60, p. 421-67, 2003.

HAMEL, R. DEJAINAC, O.; WICHET, S.; ECHARYWAT, P.; NEYRET, A.; LUPLESTLOP, N.; LECOIN, M. P.; TALIGANANI, L.; THOMAS, F.; LORNEAU, V. M. C.; CHOUMET, V.; BRIANT, L.; DESPRES, P.; AMARA, A.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of virology**, v. 89, p. 8880–96, 2015.

HE, J.; PENG, L.; LAI, H.; HURTADO, J.; STAHNKE, J.; CHEN, Q. A plant-produced antigen elicits potent immune responses against West Nile virus in mice. **Biomed Res Int**, v. 14, p. 865, 2014.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **J Clin Virol**, v. 55, p. 289-295, 2012.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viroses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, p. 376, 1990.

HERTZ, T.; BEATTY, P. R.; MACMILLEN, Z.; KILLINGBEECK, S. S.; WANG, C.; HARRIS, E. Antibody Epitopes Identified in Critical Regions of Dengue Virus Nonstructural 1 Protein in Mouse Vaccination and Natural Human Infections. **J Immunol.**, v. 198, p. 4025-4035, 2017.

HOFMANN, C.; SANDIG, V.; JENNINGS, G.; RUDOLPH, M.; SCHLAG, P.; STRAUSS, M. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. **Cell Biology**, v. 92, p. 10099-10103, 1995.

HOLBROOK, M. R. Historical Perspectives on Flavivirus Research. **Viruses**, v. 9, 2017.

HOPKINS, R.; ESPOSITO, D. A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. **Biotechniques**. v. 47, p. 785-788, 2009.

HORI, T.; KIUCHI, T.; SHIMADA, T.; NAGATA, M.; KATSUMA, S. Silkworm plasmatocytes are more resistant than other hemocyte morphotypes to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 102-104, 2013.

HORSTICK, O.; MARTINEZ, E.; GUZMAN, M.G.; MARTIN, J.L.S.; RANZINGER, S.R. Who dengue case classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. **Pathog Glob Health**, v. 109, p. 19–25, 2015.

HOUIMEL M.; DELLAGI K. Peptide mimotopes of rabies virus glycoprotein with immunogenic activity. **Vaccine**, v. 27, p. 4648–4655, 2009.

HUANG, S. S. LI, I. H.; HONG, P. D.; YEH, M. K. Evaluation of protective efficacy using a nonstructural protein NS1 in DNA vaccine-loaded microspheres against dengue 2 virus. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 3161-9, 2013.

ICTV. (2012) INTERNAIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES., Vol. 2013.

IKEDA, M.; YAMADA, H.; HAMAJIMA, R.; KOBAYASHI, M. Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. **Virology**, v. 435, p. 1-13, 2013.

IWASAKI, Y. Spread of virus within the central nervous system. **The natural history of rabies**, p. 121-132, 1991.

JACOB, Y.; BADRANE, H.; CECCALDIC, P. E.; TORDO, N. L. Cytoplasmic Dynein LC8 Interacts with Lyssavirus Phosphoprotein. **Journal of Virology**, v. 74, p. 10217-10222, 2000.

JAHANSHAH, P.; ZALNEZHAD, E.; SEKARAN, S. D.; ADIKAN, F. R. M. Rapid immunoglobulin M-based dengue diagnostic test using surface plasmon resonance biosensor. **Scientific Reports**, v. 24, n. 4, p. 3851, 2014.

JALLET, C.; JACOB, Y.; BAHLOUL, C.; DRINGS, A.; DESMEZIERES, E.; TORDO, N.; PERRIN, P. Chimeric lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential, **Journal of Virology**, v. 73, p. 225–233, 1993.

JARVIS, D. L. Baculovirus expression vectors. The baculoviruses. **Plenum Press**, 1997.

JE, Y. H.; JIN, B. R.; PARK, H. W.; ROH, J. Y.; CHANG, J. H.; SEO, S. J.; OLSZEWSKI, J. A.; O'REILLY, D. R.; KANG, S. K. Baculovirus expression vectors that incorporate the foreign protein into viral occlusion bodies. **Biotechniques**, v. 34, p. 81-7, 2003.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THIEM, S. M.; VLAK, J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, p. 257-66, 2006.

JOSHUA, M. N.; QI, Y.; FU-HUA, Y.; YOUNG-XIU, H. Comparison of the biological activities of human immunodeficiency virus 1 P24 and GP41 expressed in *Spodoptera frugiperda* cells by use of bac-to-bac system. **Acta virologica**, v. 44, p. 125-130, 2000.

KAROLINY, A. DAMASCENO, D.; OLIVEIRA, C. R.; SILVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. E.; COLTRO, W. K. T. Dengue diagnosis on laser printed microzones using smartphone-based detection and multivariate image analysis. **Analytical Methods**, v. 8, p. 6506-6511, 2016.

KAWANO, H.; MIFUNE, K.; OHUCHI, M.; MANNEN, K.; CHO, S.; HIRAMATSU, K.; SHICHIJO, A. Protection against rabies in mice by a cytotoxic T cell clone recognizing the glycoprotein of rabies virus. **Journal of general virology**, v. 71, p. 281-287, 1990.

KEDDIE, B. A.; APONTE, G.W.; VOLKMAN, L. E. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. **Science**, v. 243, p. 1728-1730, 1989.

KHAN, R. A.; AFROZ, S.; MINHAS, G.; BATTU, S.; KHAN, N. Dengue virus envelope protein domain III induces pro-inflammatory signature and triggers activation of inflammasome. **Cytokine**, v. 123, p. 154-780, 2019.

KIKHNO, I.; GUTIERREZ, S.; CROIZIER, L.; FERBER, M. L. Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.** v. 83, p. 3013-3022, 2002.

KINDHAUSER, M. K.; TOMAS, F.; SANTHANA, V.; SHANKAR, R.; CHRISTOPHER, D. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 9, p. 675, 2016.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. Virus taxonomy. **Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 486-487, 2012.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. **Trends in Biotechnology**, v. 20, p. 173-80, 2002.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 567-75, 2005.

KOTAIT, I.; CARRIERI, J. P.; TAKAOKA, N. Y. Raiva: Aspectos gerais e clínica. São Paulo: **Instituto Pasteur**, 2009.

KOPROWSKI, H.; COX, H. Studies on Chick Embryo adapted Rabies Virus. I. Culture Characteristics and Pathogenicity. **Journal of immunology**, v. 60, p. 533-554, 1948.

KRELL, P. J.; Passage effect of vírus infection in insect cells. **Cytotechnology**, v. 20, p. 125-137, 1996.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C. T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUSS, E. G.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**. v. 108, p. 717-725, 2002.

LAI, H.; PAUL, A. M.; SUN, H.; HE, J.; YANG, M.; BAI, F.; CHEN, Q. A plant-produced vaccine protects mice against lethal West Nile virus infection without enhancing zika or dengue virus infectivity. **Vaccine**, v. 36, p. 1846-1852, 2018.

LACKAY, S. N.; KUANG, Y.; FU, Z. F. Rabies in small animals. **Veterinary clinics Small animal practice**, v. 38, p. 851-861, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, Y. C.; CHUANG, Y. C.; LIU, C. C.; HO, T. S.; LIN, Y. S.; ANDERSON, R.; YEH, T. M. Antibodies Against Modified NS1 Wing Domain Peptide Protect Against Dengue Virus Infection. **Sci Rep**, v. 7, p. 6975, 2017.

LEE, H. H.; MILLER, L. K. Isolation of genotypic variants of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. **J. Virol.** V. 27, P. 754-767, 1978.

LENTZ, T.L.; BURRAGE, T.G.; SMITH, A.L.; CRICK, J.; TIGNOR, G.H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v. 215, p. 182-4, 1982.

LEPORE, L. S.; ROELVINK, P. R.; GRANADOS, R. R. Enhancin, the Granulosis Virus Protein That Facilitates Nucleopolyhedrovirus (NPV) Infections, Is a Metalloprotease. **J. Invertebr. Pathol.** v. 68, p. 131–140, 1996.

LESSLER, J.; CHAISSON, L. H.; KUCIRKA, L. M.; BI, Q.; GRANTZ, K.; SALJE, H.; RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, n. 46, p. 601–604, 2016.

LETA, S. BEYENE, T. J.; DE CLERCQ, E. M.; AMENU, K.; KRAEMER, M. U. G.; REVIE, C. W. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 25–35, 2018.

LI, B.; WU, H. Y.; QIAN, X. P.; LI, Y.; CHEN, W. F. Expression, purification and serological analysis of hepatocellular carcinoma associated antigen HCA587 in insect cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, p. 678-682, 2003.

LI, Z.; BLISSARD, G. W. The *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus GP64 Protein: Analysis of Transmembrane Domain Length and Sequence Requirements. **J Virol.** v. 83, p. 4447-4461, 2009.

LIANG, X.; LU, Z-L.; WEI, B-X.; FENG, J-L.; QU, D.; LUO, T. R. Phylogenetic analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedrin and p10 genes in wild isolates from Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. **Virus Genes**, v. 46, p.140-151, 2013.

LIBRATY, D. H.; YOUNG, P. R.; PICKERING, D.; ENDY, T. P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis.** v. 186, p. 1165-8, 2002.

LIMA, A. A. **O papel das enzimas quitinase e catepsina na patologia viral de baculovirus.** Universidade de Brasília, Tese de Doutorado, 2013.

LIN, Y. L.; LIAO, C. L.; CHEN, L. K.; YEH, C. T.; LIU, C. I.; MA, S. H.; HUANG, Y. Y.; HUANG, Y. L.; KAO, C. L.; KING, C. C. Study of Dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. **J Virol**, v. 72, p. 9729-37, 2011.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viroses and their replication. In: D. M. Knipe and P. M. Howley, **Fields Virology**, v. 5, p. 1101-1152, 2007.

LIN, C. F.; LEI, H. Y.; SHIAU, A. L.; LIU, H. S.; YEH, T. M.; CHEN, S. H.; LIU, C. C.; CHIU, S. C.; LIN, Y. S. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. **J Immunol**, v. 169, p. 657-64, 2002.

LIN, H. E. TSAI, W. Y.; LIU, I. J.; LI, P. C.; LIAO, M. Y.; TSAI, J. J.; WU, Y. C.; LAI, C. Y.; LU, C. H.; HUANG, J. H.; CHANG, G. J.; WU, H. C.; WANG, W. K. Analysis of epitopes on dengue virus envelope protein recognized by monoclonal antibodies and polyclonal human sera by a high throughput assay. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 6, p. 1447, 2012.

LIU, Y.; DECAROLIS, N.; BEEK, N. V. Protein production with recombinant baculoviruses in lepidopteran larvae. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 388, p. 267–80, 2007.

LODMELL, D.L.; ESPOSITO, J.J.; EWALT, J.C. Live vaccinia-rabies virus recombinants, but not an inactivated rabies virus cell culture vaccine, protect B-lymphocyte-deficient A/WySnJ mice against rabies: considerations of recombinant defective poxviruses for rabies immunization of immunocompromised individuals. **Vaccine**, v. 22, p. 3329–3333, 2004.

LOZA-RUBIO, E.; ROJAS E.; GÓMEZ L.; OLIVERA M. T.; GÓMEZ-LIM, M. A. Development of an edible rabies vaccine in maize using the Vnukovo strain. **Developments in biologicals**, v. 131: p. 477-482, 2007.

LUCKOW, V. A.; LEE, S. C.; BARRY, G. F.; OLINS, P. O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia Coli*. **J. Virol**, v. 67, p. 4566-79, 1993.

LUO, M.; GREEN, T. J.; ZHANG, X.; TSAO, J.; QIU, S. Conserved characteristics of the rhabdovirus nucleoprotein. **Virus Research**, v.129, p. 246-251, 2007.

LYONS, A.; LONGFIELD J.; KUSCHNER R.; STRAIGHT T.; BINN L.; SERIWATANA J.; REITSTETTER R.; FROH I. B.; CRAFT D.; MCNABB K.; RUSSELL K.; METZGAR

D.; LISS A.; SUN X.; TOWLE A.; SUN W. A double-blind, placebo-controlled study of the safety and immunogenicity of live, oral type 4 and type 7 adenovirus vaccines in adults. **Vaccine**, v. 26, p. 2890-2898, 2008.

MA, L.; JONES, C. T.; GROSCH, T.D.; KUHN, R. J.; POST, C. B. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3414-3419, 2004.

MANSFIELD, K.L.; JOHNSON, N.; FOOKS, A.R. Identification of a conserved linear epitope at the N terminus of the rabies virus glycoprotein. **J Gen Virol**, v. 85, p. 3279–3283, 2004.

MS - Ministério da Saúde. Zika virus. 2019.

MARISSSEN, W. E.; KRAMER, R. A.; RICE, A.; WELDON, W. C.; NIEZGODA, M.; FABER, M.; SLOOTSTRA, J. W.; MELOEN, R. H.; HORST, M. C.; VISSER, T. J.; JONGENELEN, M.; THIJSSSE, S.; THROSBY, M.; KRUIF, J.; RUPPRECHT, C. E.; DIETZSCHOLD, B.; GOUDSMIT, J.; BAKKER, A. B. H. Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis. **Journal of Virology**, v. 79, p. 4672-4678, 2005.

MARTINA, B. E.; KORAKA, P.; VAN DEN DOEL, P.; VAN AMERONGEN, G.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D. Immunization with West Nile virus envelope domain III protects mice against lethal infection with homologous and heterologous virus. **Vaccine**, v. 26, p. 153-157, 2008.

MASON, P. W.; ZUGEL, M. U.; SEMPRONI, A. R.; FOURNIER, M. J.; MASON, T. L. The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli*. **J Gen Virol**, v. 71, p. 2107–2114, 1990.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropical**, v. 166, p.155-163, 2017.

McARTHUR, M. A. Zika virus: Recent advances towards the development of vaccines and therapeutics. **Viruses**, v. 9, 2017.

MEANS, J. C.; PASSARELLI, A. L. Viral fibroblast growth factor, matrix metalloproteases, and caspases are associated with enhancing systemic infection by baculoviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 107, p. 9825–9830, 2010.

MENA, J. A.; KAMEN, A. A. Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. **Expert review of vaccines**, v. 10, p. 1063-1081, 2011.

MESLIN, F. X.; FISHBEIN, D.; MATTER, H. C. **Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries**. Berlin, Springer, p. 1-26, 1994.

MILES, M.; WALLACE, G.; CLARKE, J. Multiple peptide synthesis (Pepscan method) for the systematic analysis of B-and T-cell epitopes: application to parasite proteins. **Parasitology Today**, v. 5, p. 397-400, 1989.

MLAKAR, J. KORVA, M.; TUL, N.; POPOVIC, M.; POLISAK-PRIJATELJ, M.; MRAZ, J.; KOLENC, M. Zika vírus associated with microcephaly. **N Engl J Med**. V. 374, p. 951–8, 2016.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 6986–91, 2005.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. **J Clin Virol**, V. 64, P. 160-173, 2015.

MONATH, T. P.; CETRON, M. S.; McCARTHY, K.; NICHOLS, R.; ARCHAMBAULT, W. T.; WELD, L.; BEDFORD, P. Yellow fever 17D vaccine safety and immunogenicity in the elderly. **Hum Vaccin**, v. 1, p. 207-214, 2005.

MONATH, T. P. Treatment of yellow fever. **Antiviral Res**, v. 78, p. 116-124, 2001.

MONSMA, S. A.; OOMENS, A. G.; BLISSARD, G. W. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. **J. Virol**, v. 70, p. 4607-16, 1996.

MONTOR, W. R.; SORAYA, M.C. Insetos como biofábricas de proteínas humanas. **Ciência Hoje, Biotecnologia**, v. 33, p. 16-23, 2003.

MORII, M.; YOSHIMATSU, K.; ARIKAWA, J.; KARIWA, H.; ZHOU, G.; TAKASHIMA, I. Antigenic characterization of hantaan and seoul virus nucleocapsid proteins expressed by recombinant baculovirus: Application of a truncated protein, lacking an antigenic region common to the two viruses, as a serotyping antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p 2514-2521, 1998.

MORIMOTO, K.; HOOPER, D. C.; SPITSIN, S.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. **Journal of virology**, v. 73, p. 510-518, 1999.

MORIMOTO, K.; MCGETTIGAN, J. P.; FOLEY, H. D.; HOOPER, D. C.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNELL, M. J. Genetic engineering of live rabies vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 3543-3551, 2001.

MORLA, S.; MAKHIJA, A.; KUMAR, S. Synonymous codon usage pattern in glycoprotein gene of rabies virus. **Gene**. v. 10, p. 1-6, 2016.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 257-289, 1999.

MOYLE, P. M.; TOTH, I. Modern subunit vaccines; development, components, and research opportunities. **Chem Med Chem**, v. 8, p. 360-376, 2013.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, p. 13–22, 2005.

MULLER, D. M.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, v. 13, p. 0166-3542, 2013.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**, 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

MURPHY, B. R., NATHANSON, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 587-619, 1994.

MUSTAFA, M.S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Med journal, Armed Forces India**, v. 71, p. 67–70, 2015.

NAGAYA, H.; KANAYA, T.; KAKI, H.; TOBITA, Y.; TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, H. Establishment of a large-scale purification procedure for purified recombinant bovine interferon-tau produced by a silkworm-baculovirus gene expression system. **J. Vet Med Sci**, v. 66, p. 1395-401, 2004.

NEDJADI T.; EI-KAFRAWY, S.; SOHRAB, S. S.; DESPRES, P.; DAMANHOURI, G.; AZHAR, E. Tackling dengue fever: Current status and challenges. **Viol J.** v. 12, p. 212, 2015.

NGUYEN, T. T.; LEE, S.; WANG, H. K.; CHEN, H. Y.; WU, Y. T.; LIN, S. C.; KIM, D. W.; KIM, D. In vitro evaluation of novel inhibitors against the NS2B-NS3 protease of dengue fever virus type 4. **Molecules**, v. 18, P. 15600-15612, 2013.

NI, Y.; TOMINAGA, Y.; HONDA, Y.; MORIMOTO, K.; SAKAMOTO, S.; KAWAI, A. Mapping and characterization of a sequential epitope on the rabies virus glycoprotein which is recognized by a neutralizing monoclonal antibody, RG719. **Microbiol Immunol**, v. 39, p. 693–702, 1995.

NIEDERHAUSER, S.; BRUEGGER, D.; ZAHNO, M.L.; VOGT, H.R.; PETERHANS, E.; ZANONI, R.; BERTONI, G. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. **Vaccine**, v. 26, p. 6749–6753, 2008.

NIU, Y.; LIU, Y.; YANG, L.; QU, H.; ZHAO, J.; HU, R.; LI, J.; LIU, W. Immunogenicity of multi-epitope-based vaccine candidates administered with the adjuvant Gp96 against rabies. **Virologica Sinica**. p. 75-168, 2016.

NOGUEIRA, R. M. MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E.; SCHATZMAYER, H. G. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 85, p. 253, 1990.

NOGUEIRA, R. M. SCHATZMAYR, H. G.; DE FILIPPIS, A. M.; DOS SANTOS, F. B.; DA CUNHA, R. V.; COELHO, J. O.; DE SOUZA, L. J.; GUIMARÃES, F. R.; DE ARAÚJO, E. S.; DE SIMONE, T. S.; BARAN, M.; TEIXEIRA, G. JR.; MIAGOSTOVICH, M. P. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis**. v. 11, p. 1376-81, 2005.

NOGUEIRA, R. M.; EPPINGHAUS, A. L. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 255-6, 2011.

OLIVEIRA, V. C.; BARTASSON, L.; DE CASTRO, M. E. B.; CORRÊA, J. R.; RIBEIRO, B. M.; RESENDE, R. O. A silencing suppressor protein (NSs) of a tospovirus enhances baculovirus replication in permissive and semipermissive insect cell lines. **Virus Research**, v. 155, p. 259-267, 2011.

OLLIARO, P.; FOUQUE, F.; KROEGER, A.; BOWMAN, L.; VELAYUDHAN, R.; SANTELLI, A. C.; GARCIA, D.; RAMM, R. S.; SULAIMAN, L. H.; TEJEDA, G. S.; MORALES, F. C.; GOZZER, E.; GARRIDO, C. B.; QUANG, L. C.; GUTIERREZ, G.; YADON, Z. E.; RUNGE-RANZINGER, S. Improved tools and strategies for the prevention and control of arboviral diseases: A research-to-policy forum. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 12, p. 1-13, 2018.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors - a laboratory manual**. New York: W. H. Freeman, 1992.

OSANAI, C. H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; TANG, A. T.; DO AMARAL, R. S.; PASSOS, A. D.; TAUIL, P. L. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 25, p. 53-4, 1983.

PACHECO, O.; BELTRÁN, M.; NELSON, C. A.; VALENCIA, D.; TOLOSA, N.; FARR, S. L.; OSPINA MARTÍNEZ, M. L. Zika Virus Disease in Colombia - Preliminary Report. **The New England Journal of Medicine**, p. 1–10, 2016.

PAL, S.; DAUNER, A. L.; MITRA, I.; FORSHEY, B. M.; GARCIA, P.; MORRISON A. C. Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples. **PloS one**, v. 9, p. 113411, 2014.

PANWAR, U.; SINGH, S. K. An Overview on Zika Virus and the Importance of Computational Drug Discovery. **Journal of Exploratory Research in Pharmacology**, vol. 3, p. 43–51, 2018.

PAUDEL, D.; JARMAN, R.; LIMKITTIKUL, K.; KLUNGTHONG, C.; CHAMNANCHANUNT, S.; NISALAK, A. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. **N Am J Med Sci**, v. 3, p. 478–85, 2011.

PENG, J.; ZHONG, J. R. GRANADOS, R. A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. **J. Insect Physiol**. v. 45, p. 159–166, 1999.

PICCINI, L. E.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Dengue-3 Virus Entry into Vero Cells: Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in the Outcome of Infection. **PLoS One**. v. 10, p. 140824, 2015.

PINTO R. M.; BOSCH A.; BISHOP, D. H. L. Structures associated with the expression of rabies virus structural genes in insect cells. **Virus Research**, v. 31, p. 139-145, 1994.

PLOTKIN, S. A. Rabies. **Clinical Infectious Diseases**. v. 30, p. 4–12, 2000.

PLOTKIN, S. A: Vaccines: past, present and future. **Nat Med**, v. 11, p. 5-11, 2005.

POGGIANELLA, M.; SLON CAMPOS, J. L.; CHAN, K. R.; TAN, H. C.; BESTAGNO, M.; OOI, E. E.; BURRONE, O. R. Dengue E Protein Domain III-Based DNA Immunisation Induces Strong Antibody Responses to All Four Viral Serotypes. **PLoS Negl Trop Dis**. V. 9, P. 3947, 2015.

PRADO, P. S. **Validação e confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo para o diagnóstico da dengue na rede de saúde pública do Distrito Federal**. Tese de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical pela Universidade Federal de Brasília – UNB, 2015.

QI, R.; ZHANG, L.; CHI, C.W. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. **Acta Biochim Biophys Sin**, V. 40, p. 91–101, 2008.

QIAO, M.; ASHOK, M.; BERNARD, K. A.; PALACIOS, G.; ZHOU, Z. H.; LIPKIN, W. I.; LIANG, T. J. Induction of sterilizing immunity against West Nile Virus (WNV) by immunization with WNV-Like particles produced in insect cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, p. 2104-2108, 2004.

RABAAN, A. A.; BAZZI, A. M.; AL-AHMED, S. H.; AL-GHAITH, M. H.; AL-TAWFIQ, J. A. Overview of Zika infection, epidemiology, transmission and control measures. **Journal of Infection and Public Health**, 2016.

RANJIT, S.; KISSOON, N. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. **Pediatric Critical Care Medicine: a Journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, v. 12, p. 90-100, 2011.

RASTOGI, M.; SHARMA, N. SINGH, S. K. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. **Virologia**, v. 29, p. 131, 2016.

RATHER, I. A.; PARRAY, H. A.; LONE, J. B.; PAEK, W. K.; LIM, J.; BAJPAI, V. K.; PARK, Y. H. Prevention and Control Strategies to Counter Dengue Virus Infection. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 7, p. 336, 2017.

RATY, J. K.; LESCH, H. P.; WIRTH, T.; YLA-HERTTUALA, S. Improving safety of gene therapy. **Curr Drug Saf**, v. 3, p. 46-53, 2008.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 27, p. 493-497, 1938.

RIBEIRO, B. M.; MORGADO, F. S.; DA SILVA, L. A.; CRUZ, F. S.; CHAVES, L. C.; QUIRINO, M. S.; ANDRADE, M. S.; CORREA, R. F. T. **Baculovirus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos.** In: Rodrigo Ribeiro Resende; Carlos Ricardo Soccol. (Org.). *Biotecnologia Aplicada à Saúde* - v. 2, p. 255-306, 2015.

RICA, C.; LUCIA, S. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015 – 2016. Cumulative cases, (September), 2016.

RIGAU-PEREZ, J. Severe dengue: the need for new case definitions. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 297–302, 1998.

RODENHUIS-ZYBERT, I.A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J.M. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences.** p. 2773–86, 2010.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; CORDEIRO, M. T.; BRAGA, C.; DE SOUZA, W. V.; MARQUES, E. T.; CUMMINGS, D. A. From Re-Emergence to hyperendemicity: The Natural History of the Dengue Epidemic in Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis**, v. 5, p. 935, 2011.

ROHRMANN, G. **Polyhedrin structure.** *Journal of General Virology*, v. 67, p. 1499-1513, 1986.

ROHRMANN G.F. **Baculovirus molecular biology.** Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); NCBI; 2013.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology**. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); NCBI; 2011.

ROSS, T. M. Dengue virus. **Clin Lab Med**, v. 30, p. 149-60, 2010.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, p. 327-343, 2002.

RYCHLOWSKA, M.; GROMADZKA, B.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; SZEWEZYK, B. Application of baculovirus-insect cell expression system for human therapy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 12, p. 1840-1849, 2011.

SAIZ, J. C. VÁZQUEZ-CALVO, Á.; BLÁZQUEZ, A. B.; MERINO-RAMOS, T.; ESCRIBANO-ROMERO, E.; MARTÍN-ACEBES, M. A. Zika virus: the latest newcomer. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 496, 2016.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Third Edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 2001.

SANTIAGO, G. A.; VAZQUEZ, J.; COURTNEY, S. VÁZQUEZ, J.; COURTNEY, S.; MATÍAS, K. Y.; ANDERSEN, L. E.; COLÓN, C.; BUTLER, A. E.; ROULO, R.; BOWZARD, J.; VILLANUEVA, J. M.; MUÑOZ-JORDAN, J. L. Performance of the Trioplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nat Commun**, v. 9, 2018.

SAUNIER, B.; TRIYATNI, M.; ULIANICH, L.; MARUVADA, P.; YEN, P.; KOHN, L. D. Role of the Asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. **Journal of Virology**, v. 77, p. 546-559, 2003.

SAXENA, P. , DASH, P. K.; SANTHOSH, S. R.; SHRIVASTAVA, A.; PARIDA, M. R, P. L. Development and evaluation of one step single tube multiplex RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. **Virology Journal**, v. 5, p. 20, 2018.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R, TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 81, p. 245–246, 1986.

SEIF, I.; COULON, P.; ROLLIN, P. E.; FLAMMAND, A. Rabies virulence: Effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations effecting antigenic site III on the glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 53, p. 926-934, 1985.

SHAMS, H. Recent developments in veterinary vaccinology. **Vet J.** v. 170, p. 289-299, 2005.

SHARP, T. M.; FISCHER, M.; MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; PAZ-BAILEY, G.; STAPLES, J. E.; GREGORY, C. J.; WATERMAN, S. H. Dengue and Zika Virus Diagnostic Testing for Patients with a Clinically Compatible Illness and Risk for Infection with Both Viruses. **Centers for disease for control and prevention**, v. 68, p. 1-10, 2019.

SHRESTA, B.; BRIEN, J. D.; SUKUPOLVI-PETTY, S.; AUSTIN, S. K.; EDELING, M. A.; KIM, T.; O'BRIEN, K. M.; NELSON, C. A.; JOHNSON, S.; FREMONT, D. H.; DIAMOND, M. S. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. **PLoS Pathog.** V. 6, p. 823, 2010.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MEYERS, G.; MONATH, T. Ictv Report, C. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **J Gen Virol**, v. 98, p. 2-3, 2017.

SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I. Recent advances in peptide-based subunit nanovaccines. **Nanomedicine (Lond)**, v. 9, p. 2657-2669, 2011.

SLOOTSTRA, J. W.; PUIJK, W. C.; LIGTVOET, G. J.; LANGEVELD, J. P.; MELOEN, R. H. Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. **Molecular diversity**, v. 1, p. 87-96, 1996.

SMITH, J.; YAGER, P.; BAER, G. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. **Laboratory techniques in rabies**, v. 4, p. 200-208, 1996.

STAPLES, J. E.; GERSHMAN, M.; FISCHER, M. Centers for disease C, Prevention: yellow fever vaccine: recommendations of the advisory Committee on immunization practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep**, v. 59, p. 1-27, 2010.

STEPHENSON, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. **Bull World Health Organ**, v. 83, p. 308-314, 2005.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus membrane fusion. **J Gen Virol**. v. 87, p. 2755-66, 2006.

SUMATHY, S.; PALHAN, V. B.; GOPINATHAN, K. P. Expression of human growth hormone in silkworm larvae through recombinant Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus. *Protein Expression Purification*, v. 7, p. 262-8, 1996.

TAUIL, P. L. Critical aspects of dengue control in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, 2002.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. Diagnosis and management of dengue. **BMJ**. v. 18, p. 339, 2009.

THEEL, E. S.; HATA, D. J. Diagnostic testing for Zika virus: a postbreak update. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, 2018.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. **Virology**, v. 165, p. 565-576, 1988.

TSIANG, H. Pathophysiology of rabies virus infection of the nervous system. **Advances in virus research**, v. 42, p. 375-412, 1993.

UNNIKRISHNAN, R.; FAIZAL, B. P.; VIJAYAKUMAR, P.; PAUL, G.; SHARMA, R. N. Clinical and laboratory profile of dengue in the elderly. **J Family Med Prim Care**. V. 4, p. 369–372, 2015.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia, Serv. Saúde**, v. 25, 2016.

VASCONCELOS, P. F. [Yellow Fever]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, p. 275-293, 2003.

VAUGHN, J. L.; GOODWIN, R. H.; TOMPKINS, G. J.; McCRAWLEY, P. The establishment

of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). **In vitro**, v. 13, p. 213-217, 1977.

VESSARO-SILVA, S. A.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BAGGIO, M. P. D.; RIBEIRO, L. F. C. Cells of the rectum of *Bombyx mori* affected by experimental inoculation with Alphabaculovirus. **Genetic and Molecular Research**, v. 13, p. 6885-6891, 2014.

VESSARO-SILVA, S. A.; MIRANDA-NETO, M. H.; BRANCALHÃO, R. M. C.; RIBEIRO, L. F. C.; GUIMARAES, A. T. B.; OLIVEIRA, C. M. T. Antioxidant Systems as a Response to Midgut Cellular of *Bombyx mori* Lineu, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) Infection for Baculoviruses. **Journal of Economic Entomology**, v. 3, p. 1-9, 2019.

VIGILATO, M. A. N.; CLAVIJO, A.; KNOBL, T.; SILVA, H. M.; COSIVI, O.; SCHNEIDER, M. C.; LEANES, L. F.; BELOTTO, A. J.; ESPINAL, M. A. Progress towards eliminating canine rabies: policies and perspectives from Latin America and the Caribbean. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 368: p. 201-210, 2013.

VILLAR, L. DAYAN, G. H.; ARREDONDO-GARCÍA, J. L.; RIVERA, D. M.; CUNHA, R.; DESEDA, C.; REYNALES, H.; COSTA, M. S.; MORALES-RAMÍREZ, J. O.; CARRASQUILLA, G.; REY, L. C. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **N Engl J Med**, v. 372, p. 113–123, 2015.

VOLK, D. E.; FIONA, J. M.; GANDHAM, S. H. A.; ANDERSON, A.; LINDERN, J. J. V.; BEASLEY, D. W. C.; BARRETT, A. D. T.; GORENSTEIN, D. G. Structure of Yellow Fever Virus Envelope Protein Domain III. **Virology**, v. 394, p.12-8, 2009.

WANG, Y.; CHOI, J. Y.; ROH, J. Y.; WOO, S. D.; JIN, B. R.; JE, Y. H. Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice, p. 2061–2068, 2017.

WANG, S. M.; SEKARAN, S. D. Evaluation of a Commercial SD Dengue Virus NS1 Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Early Diagnosis of Dengue Virus Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 2793-2979, 2010.

WATTERSON, D.; MODHIRAN, N.; YOUNG, P. R. The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. **Antiviral Research**, v. 130, p. 7-18, 2016.

WEAVER, S.C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, v. 85, p. 328-45, 2010.

WHITAKER, J.A.; OVSYANNIKOVA, I. G.; POLAND, G. A. Adversomics: a new paradigm for vaccine safety and design. **Expert Ver Vaccines**, v. 14, p. 935-347, 2015.

WHITT, M. A.; BUONOCORE, L.; PREHAUD, C.; ROSE, J.K. Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the Rabies virus glycoprotein. **Virology**, v. 185, p. 681-688, 1991.

WHO - World Health Organization – dengue virus, 2015.

WHO - World Health Organization - Monoclonal antibody cocktail for rabies post exposure treatment: report of a WHO consultation, 2002.

WHO - World Health Organization - Rabies, 2016.

WHO - World Health Organization – dengue virus vaccine, 2017.

WHO - World Health Organization – Fever Yellow virus, 2018.

WHO - World Health Organization – zika virus, 2019.

WILDER-SMITH, A.; BYASS, P. The elusive global burden of dengue. **Lancet Infect Dis**, v. 16, p. 629–31, 2016.

WILLIAMS, G. V.; ROHEL, D. Z.; KUZIO, J.; FAULKNER, P. A Cytopathological Investigation of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus p10 Gene Function Using Insertion/Deletion Mutants. **J. gen. Virol.** V. 70, P. 187-202, 1989.

WU, Q.; YU, F.; XU, J.; LI, Y.; CHEN, H.; XIAO, S.; FU, Z. F.; FANG, L. Rabies-virus-glycoprotein-pseudotyped recombinant baculovirus vaccine confers complete protection against lethal rabies virus challenge in a mouse model. **Veterinary Microbiology.** p. 1-30, 2014.

WUNNER, W. H. Rabies Virus. **Elsevier Ltda** p. 23-68, 2007.

XU, X. G.; WANG, Z. S.; ZHANG, Q.; LI, Z. C.; ZHAO, H. N.; LI, W.; TONG, D. W.; LIU, H. J. Baculovirus surface display of E envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus and its immunogenicity of the displayed proteins in mouse and swine models. **Vaccine**, v. 29, p. 636-643, 2011.

YANG, D. G.; CHUNG, Y. C.; LAI, Y. K.; LAI, C. W.; LIU, H. J.; HU, Y. C. Avian influenza virus hemagglutinin display on baculovirus envelope: cytoplasmic domain affects virus properties and vaccine potential. **Mol Ther**, v. 15, p. 989-996, 2007.

YANG, J.; GUAN, L.; GUO, Y.; DU, L.; WANG, F.; WANG, Y. Expression of biologically recombinant human acidic fibroblast growth factor in *Arabidopsis thaliana* seeds via oleosin fusion technology. **Nature**, v. 566, p. 89-94, 2015.

YOTO, Y. KUDOH, T.; HASEYAMA, K.; CHIBA, S.; MATSUNAGA, Y.; YAMAZAKI, S. Serological diagnosis for human parvovirus B19 infection by an enzyme immunoassay kit with recombinant antigens synthesized in a baculovirus expression system. **Kansenshogaku Zasshi, Sapporo**, v. 69, p. 1135-1140, 1995.

YOUNG, P. R. HILDITCH, P. A.; BLETCHLY, C.; HALLORAN, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000.

ZHANG, H. WEN, W.; HAO, G.; CHEN, H. QIAN, P.; LI, X. A subunit vaccine based on E2 protein of atypical porcine pestivirus induces Th2-type immune response in mice. **Viruses**, v. 10, 2003.

ZHANG, Y.; HAYES, E. P.; McCARTY, T. C.; DUBOIS, D. R.; SUMMERS, P. L.; ECKELS, K. H.; CHANOCK, R. M.; LAI, C. Immunization of mice with Dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by Baculovirus recombinant induces resistance to Dengue Virus Encephalitis. **Journal of Virology**, v. 62, p. 3027-3031, 1988.

ZHOU, Y.; CHEN, H.; LI, X.; WANG, Y.; CHEN, K.; ZHANG, S. Production of recombinant human DNA polymerase delta in a *Bombyx mori* bioreactor. **Plos One**, v. 6, p. 2224, 2011.

Yellow fever virus envelope protein domain III fused to the polyhedrin protein of a baculovirus elicits a Th1/Th17 immune response in mice

Lorena C. S. Chaves¹, Mayartha P. D. Baggio¹, Camila Tavares², Daniel M. P. Ardisson-Araújo³, Anamélia L. Bocca², Bergmann M. Ribeiro^{1*}.

¹ Laboratory of Baculovirus, Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

² Laboratory of applied immunology, Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

³ Laboratory of Insect Virology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

* Corresponding author.

Abstract

Background: The Baculovirus expression vector system (BEVS) is a versatile protein expression platform that can be used in different ways to produce high levels of recombinant proteins. For instance, it is possible to perform the fusion of the gene of interest with the major occlusion body gene (*polyhedrin*, *polh*) of a baculovirus to generate a recombinant occlusion body (rOB). This rOB can be rapidly and easily purified by standard methods, which includes only detergent washing and centrifugation steps. The rOB can be used for the production of immunogenic proteins that can be used as vaccine antigens and diagnosis input against specific diseases. In this work, we constructed a rOB containing the yellow fever virus envelope protein domain III (EDIII) fused to the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) Polyhedrin (POLH) protein in order to be used as an immunogenic rOB.

Methods: We immunized mice with either the rOB (6xHis-EDIIIYFV-POLH) or the parental tagged OB (6xHis-POLH) version as a control. We analyzed the mice immune response triggered by the immunization. The immune response was evaluated by lymphocyte proliferation assay, IgG1/IgG2a concentration, and the cytokine levels analysis.

Results: The immunological analyses showed a specific Th1/Th17 immune response against the rOB in mice after immunization. We also analyzed that the POLH protein can act as an adjuvant during the immunization and can triggers an specific immune response. This result suggests a possible use of this rOB as an immunogen.

Conclusions: The results here presented, shows a potential method for the production of recombinant antigens for alternative vaccine development.

Keywords: Baculovirus, Occlusion bodies, Yellow fever, Vaccine development, Vaccine alternative.

Background

Yellow fever (YF) is a viral disease transmitted by mosquitoes persistently infected by the yellow fever virus (YFV) [1]. The disease is transmitted to humans and nonhumans primates by the bite of hematophagous mosquitoes belonging to genera *Haemagogus* and *Aedes* in South America and Africa [2]. The YFV transmission occurs in three cycles: sylvatic, intermediate, and urban. The *sylvatic (jungle) cycle occurs inside the rainforests between monkey of different species and mosquitoes. The intermediate cycle occurs when the virus is transmitted to humans who enter the areas where sylvatic cycle takes place, causing sporadic cases. However, it is the urban cycle that causes more concern, when the virus is propagated by the vector (*Ae. aegypti*) to human in a high populated area and causes an epidemic [3].*

YF is endemic in 47 countries in the tropical regions of Africa and South America, resulting in an estimated 200,000 cases and 30,000 deaths per year [4, 5] . Recently, two epidemics of YF happened in Angola and Brazil (2016-2017), re-opening the discussion about the best approach to keep the disease under control [6].

After the development of the live attenuated 17D vaccine in 1936, the number of YF cases reduced drastically, confirming the vaccine as a very efficient tool to prevent new cases and eradicate the disease. Nowadays two substrains are used, 17DD in Brazil and 17D-2014 in the rest of the world, reflecting different passages series [1, 7]. However, the use of live attenuated vaccines has some limitations and should not be administrated in all individuals [8] as some adverse reactions might be observed after its administration in non-risk groups [9]. These adverse reactions were named yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease (YELAVD) [9-11]. As the live attenuated vaccines has limited usage, more effort should be

invested on the development of a safer vaccine which can be administrated with no/less adverse effects when compared to the current one [12].

The use of recombinant protein-based vaccines to protect people against diseases is growing due to benefits related to the production techniques. Generally, recombinant protein-based vaccines are safer, cheaper, and a good alternative compared to live attenuated vaccines [13, 14]. Moreover, all the limitations and adverse reactions could be avoided if a larger number of alternative vaccines would be available. Therefore, several studies are being carried out using immunogenic proteins or protein regions (subunit vaccines) for the development of alternative vaccines [15-17].

Viruses belonging the genus *Flavivirus* (family *Flaviviridae*) include mosquito-borne diseases, such as YFV, Dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV), Japanese encephalitis virus (JEV), and West Nile virus (WNV). These viruses are constant targets for the development of alternative recombinant protein-based vaccines [1, 18]. The YFV genome encodes three structural proteins (Pr/M, C and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A and B, NS3, NS4A and B and NS5). The envelope (E) protein is responsible for the entry of the viral particle into the host cell and the main target of the immune response and development of subunit vaccines [19]. The E protein is divided into three domains called by I, II, and III. The Domain III (EDIII) has epitopes that are recognized by the neutralizing antibodies and is commonly studied as an immunogenic protein region for the development of subunit vaccines [20-23]

The baculovirus expression vector system (BEVS) is a powerful tool that has been widely used to express functional prokaryotic and eukaryotic proteins [24, 25] and also for the production of different types of vaccines. The most known vaccine produced using BEVS is the human papilloma virus vaccine, Cervarix[®], the first FDA approved insect cell produced product [26, 27].

The BEVS consist in the use of a recombinant baculovirus to express the protein of interest inside insect cells. The baculovirus has two different virions produced during infection cycle, the occlusion-derived virus (ODV) and the budded virus (BV). Both have the same genome but differ in morphogenesis and function during infection cycle. The ODVs are found immersed in a protein matrix forming a crystalline structure called the occlusion body (OB). The main protein of the OB is the Polyhedrin (POLH) protein in the case of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), the most studied baculovirus species to date [28]. Because POLH is highly expressed during the baculovirus infection cycle, some vectors were developed aiming the incorporation of a heterologous proteins into the OB by

merging the gene of interest with the *polyhedrin* (*polh*) gene [29, 30]. These vectors are capable of expressing POLH fused to another protein to produce recombinant OBs that can be rapidly and easily purified [24, 31].

In this study, we expressed the YFV EDIII fused to the AcMNPV POLH aiming the production of a recombinant OB (rOB) that could be used as a potential alternative subunit vaccine against the YFV. Using this method, we obtained high levels of the EDIII/POLH expression in the insect cells. The rOB was easily purified by standard detergent washes, used to immunize mice, and had the immune response evaluated. Our results demonstrated that the rOB protein triggered specific immune response in mice, acting as an effective pro-inflammatory agent that triggers the expected immune response after three immunization rounds. Thus, the use of antigenic epitopes fused to the baculovirus POLH protein shows prospective to be a good platform for expression of potential subunit vaccine candidates.

Methods

Insect cell

Trichoplusia ni (cabbage looper) BTI-Tn5B1-4 (Tn5B) cells [32] were maintained as monolayers in TC-100 medium (HIMEDIA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and an 1% antibiotic/antifungal solution (100 units/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, and 0,25 µg/mL of amphotericin B) (Gibco) at 28°C.

Wild type and recombinant viruses production

The EDIII was chemically synthesized (IDT® Integrated DNA Technologies) and used as a template for a PCR reaction using the YFEDIIIPOLHP*ci*F (*ACATGTCAAGGGGACATCCTACAA*) and YFEDIIIPOLHP*ci*R (*ACATGTTTTGTGCCACTGGTAAGTGA*) oligonucleotides that added *Pci*I restriction sites (in italics), flanking the EDIII. For this PCR reaction we used LongAmp® enzyme (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. The PCR program used was 94°C/1 min, 30 cycles of 94°C/30 s, 55°C/30 s, 72°C/1 min, and a final extension of 2 min at 72°C. The PCR fragment (310 bp) was purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), following the manufacturer's instructions. The EDIII purified fragment was cloned into the pFast-6xHis-AcPH plasmid in *Nco*I restriction sites. For pFast-6xHis-AcPH construction, we amplified the AcMNPV POLH gene using 6xHis-AcPH F (*AGA*

TCT ATG CAT CAT CAT CAT CAT TCC ATG GCC ATG CCG GAT TAT ACG TAC CGT CCG ACC ATT GG) and AcPH R (*GCG GCC GCT TAA TAC GCC GGA CCA GTG AAC AGA GGT GC*) oligonucleotides that added *BglIII* and *NotI* restriction sites (in italics), flanking the POLH gene. For this PCR reaction we used the purified DNA genome of AcMNPV-C6 and the LongAmp[®] enzyme (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. The PCR program used was 94°C/1 min, 30 cycles of 94°C/30 s, 55°C/30 s, 68°C/1 min, and a final extension of 7 min at 68°C. The PCR fragment (782 bp) was purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), following the manufacturer's instructions. The 6xHis-AcPH purified fragment was cloned into the pFastBac1 plasmid in *BamHI* and *NotI* restriction sites to generate pFast-6xHis-AcPH. This plasmid allows cloning the gene(s) of interest into an *NcoI* restriction site, which is located between a 6xHis tag and the AcMNPV *polh* gene. To construct the plasmid containing the EDIII gene fused to *polh*, the pFast-6xHis-AcPH plasmid was digested with the *NcoI* restriction enzyme (Promega), following the manufacturer's instructions, and the EDIII purified fragment was digested with the *PciI* (Promega) restriction enzyme, following manufacturer's instructions (the *NcoI* and the *PciI* restriction enzymes are isoschizomers). The digested plasmid and fragment were ligated using the T4 DNA ligase (Promega) following the manufacturer's instructions, generating the pFast-6xHis-EDIIIYFV-AcPH. The plasmids pFast-6xHis-AcPH and pFast-6xHis-EDIIIYFV-AcPH were used to generate the recombinant viruses vAc6xHis-POLH and vAc6xHis-EDIIIYFV-POLH using the Bac-to-Bac[®] system [33]. The wild type AcMNPV L-1 [34] and the recombinant baculoviruses were propagated and titered according to O'Reilly et al [24].

Expression of the recombinant proteins

To produce the rOBs, Tn5B cells (as monolayers in 75 Cm² flasks - TPP) at a density of 5×10^6 cells, were infected with the viruses vAc6xHis-POLH and vAc6xHis-EDIIIYFV-POLH using a MOI of 1. As a control, the same cells were infected with the AcMNPV under the same conditions. After 72 h p.i. the cells were collected by centrifugation at 2000 x g for 5 min at 4° C. The supernatants were discarded and the pellets were resuspended in 1X PBS (100 mM Na₂HPO₄, 17 mM KH₂PO₄, 1,4 mM NaCl and 27 mM KCl, pH 7.4). To confirm the correct expression of the recombinant proteins, all the samples were analyzed by SDS-PAGE [35]. After electrophoresis, the samples were also loaded onto a parallel 12% SDS-PAGE gel and proteins were transferred to a Nitrocellulose membrane (Gibco BRL- Life Technologies) for

western blot (WB) (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) analysis. Membranes were blocked using 3% skim milk in 1x PBS for 1 h at room temperature (RT), or overnight at 4°C. Membranes were then washed 3 times (5 min per wash) with a 1x PBS solution containing 0.05% Tween and incubated for 1 h at RT with the primary antibody. Primary antibody consisted of monoclonal anti-his antibody (1:6,000) produced in mice (GE Healthcare). After, membranes were washed 3 times (5 min per wash) as above, then incubated with an alkaline phosphatase (AP) conjugated secondary antibody (1:10,000) (goat anti-mouse IgG, Sigma), for 1 h at RT. After incubation, the membranes were washed 3 times as above and specific proteins were detected with NBT/BCIP (Invitrogen) diluted in distilled water, as described by the manufacturer's.

Purification of the recombinant proteins

The pellet of cells infected with the vAc6xHis-POLH, vAc6xHis-EDIIIYFV-POLH, and AcMNPV (control) were washed 3 times with a 1X PBS solution. For each washing step the cells were collected by centrifugation at 2,000 x g for 5 min at 4° C. In the last washing step, the pellet was resuspended in 1x of TE buffer (10 mM Tris pH 8 and 1 mM EDTA). Then, the samples were sonicated (Bandelin Sonoplus) four times de 15 s 40 kHz, after sonication the samples were centrifuged 2,000 x g for 5 min. The pellets were treated with a Triton 5% solution and centrifuged 2,000 x g for 5 min, this step was repeated twice. After, the pellets were treated with SDS (0.25%) and centrifuged 2,000 x g for 5 min, this step was repeated twice. Finally, the pellets were treated with NaCl (0.5M) once and centrifuged 2,000 x g for 5 min, the pellets were resuspended in 1x PBS and incubated at - 20° C for future analysis.

Microscopy analysis

A monolayer of Tn5B cells ($\sim 5.0 \times 10^6$ cells) was infected at a MOI of 1 with AcMNPV, vAc6xHis-POLH and vAc6xHis-EDIIIYFV-POLH. After infection, the cells were visualized using an inverted light microscope (Axiovert 100, Zeiss). For scanning electron microscopy (SEM), the purified recombinant proteins were incubated 37°C ~ 1 hour or until complete drying and coated with gold using a Sputter Coater (Balzers) before being observed with the microscopy (SEM Jeol JSM 840A) at 10 kV.

Mice immunization

]Balb/c mice (eight weeks-old females) were purchased from the University of Campinas (CEMIB, Unicamp, Brazil) and maintained under standard laboratory conditions.

Healthy mice were divided into four groups (n= 5 each group) and immunized subcutaneously with (i) PBS (500 μ l); (ii) purified 6xHis-POLH (50 μ g/dose), (iii) 6xHis-POLH-EDIIIYFV (50 μ g/dose) and (iv) 17DD yellow fever vaccine (500 UFP -500 μ L). The mice were immunized 3 times at intervals of 15 days, then euthanized 15 days after the last immunization. The animals were initially anesthetized with ketamine and xylazine (100 mg/kg and 10 mg/kg body weight). Before the euthanasia was performed the mice whole blood extraction in the carbon dioxide chamber to obtain the serum and spleen.

Lymphocyte proliferation assay

The splenocytes were isolated from the mice spleen and then labeled with CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (according to the manufacture's guidelines cat number C34554, Thermofisher) and added to 96-well culture plates [36]. To this experiment, were used two positive controls, the concanavalin A (Con A) – T cell proliferation mitogen – and lipopolysaccharide (LPS) – B cell proliferation mitogen. Each group of splenocytes was stimulated with medium only, Con A (4 μ g/ml Sigma-Aldrich), LPS (500 ng/ml Sigma-Aldrich), 6xHis-POLH (12,5 μ g/ml) and 6xHis-POLH-EDIIIYFV (12,5 μ g/ml). The cells were incubated in 5% CO₂ chamber for 4 days. After this period the cells were collected and analyzed in a flow cytometer (FACSCalibur).

Analysis of IgG1 and IgG2a concentration

The IgG1 and IgG2a isotype levels in immunized mice serum were determined by ELISA according to the manufacture's guidelines (AFFYMETRIX, INC). Briefly, 96-well plates were coated with capture antibody (anti-mouse IgG1 or anti-mouse IgG2a), blocked with bovine serum albumin and incubated with serum of immunized mice. After 12h of incubation at 4° C, the plates were washed and anti-mouse IgG biotinylated antibody was added. The plate was incubated for 3 h at room temperature, washed and incubated with substrate solution for 15 minutes at RT in the dark. The reaction was quenched with 2N sulfuric acid and the reading was performed on a spectrophotometer (Spectramax M5, Molecular Devices) using a 450nm filter. The results were expressed as ng/ml of protein comparing optical densities (OD) with a standard curve.

Cytokine levels assay

The levels of cytokines secretion were measured (ELISA) from splenocytes culture supernatant according to the manufacture's guidelines (BD Bioscience). The absolute TNF- α ,

IFN- α and IL-17 levels were calculated based on a standard curve provided by the commercial kit.

Results

Confirmation of the 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV expression using BEVS

In order to express the AcMNPV POLH protein 6xHis tagged and the AcMNPV POLH protein fused to EDIII YFV 6xHis tagged (Figures 1 and 2), the vAc6xHis-POLH and vAc6xHis-POLH-EDIIIYFV baculoviruses were constructed using the Bac-to-Bac[®] system (Invitrogen) and used to infect Tn5B insect cells at a MOI of 1. At 72 h p.i, the cells were and harvested by centrifugation and the pellet was examined by WB. The cells infected with vAc6xHis-POLH (Figure 1C lane 3) and vAc6xHisPOLH-EDIIIYFV (Figure 1C lane 4) expressed 6xHis-POLH (29.89 kDa) and 6xHisPOLH-EDIIIYFV (41.025 kDa) recombinant proteins with the expected sizes.

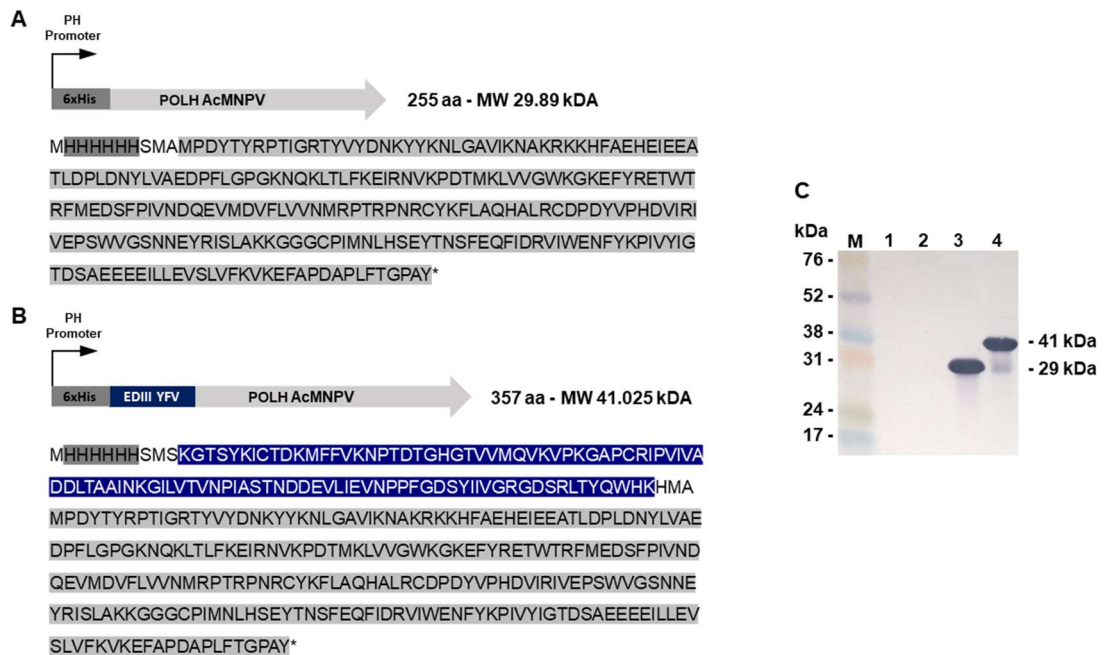


Figure 1. Recombinant protein analysis. (A) Promoter (PH – polyhedrin) and gene expression scheme of the AcMNPV N-terminal 6x His tagged *polh* gene. The amino acid sequence deduced of the tagged protein, the number of amino acids (225 aa) and the expected recombinant protein size in kDa (28.89) are shown in the figure (B) Promoter (PH – polyhedrin) and gene expression scheme of the EDIIIYFV fused to AcMNPV N-terminal 6x His tagged *polh* gene. The amino acid sequence deduced of the tagged protein, the number of amino acids (357 aa) and expected recombinant protein size in kDa (41.025) are shown in the figure (C) Western blot showing the expression of the proteins in the expected sizes. Tn5B

cells were infected with with MOI 1 of AcMNPV (2), vAc6xHis-POLH (3) and vAc6xHis-POLH-EDIIIYFV (4), or mock-infected (1) as a negative control. 72 h p.i the cells were collected, applied on a 12% SDS-page gel and the separated proteins analyzed by Western blot. The membrane was incubated with anti-his monoclonal antibody, followed by incubation with a secondary antibody alkaline phosphatase conjugated, and then analyzed. The correct size of the expected proteins are indicated in the figure, confirming the correct expression of both proteins in the insect cell. M represents the molecular weight marker (Amershan RPN800E).

Purified recombinant protein analysis

The Tn5B cells infected with AcMNPV-, vAc6xHis-POLH and vAc6xHis-POLH-EDIIIYFV were analyzed by light microscopy (Figure 2A). Typical baculovirus-induced cytopathic effects (such as rounded and large cells with hypertrophied nucleus) were observed in all infected cells. The rOBs produced in the nucleus of cells infected with vAc6xHis-POLH (Figure 2A green arrows) resembling the WT AcMNPV OBs (Figure 2A white arrows). However, when the cells were infected with vAc6xHis-POLH-EDIIIYFV we observed a protein mass in the cells' cytoplasm (Figure 2A red arrows), making the cells look bigger and rough. This difference in the OBs production could be due to the POLH and EDIII interaction. Therefore, we decided to purify these rOBs (6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV) under the same conditions, and analyze under scanning electron microscopy. The purified rOBs produced from vAc6xHis-POLH infection showed a similar structure as the wild type OBs from AcMNPV infected cells (Figure 2B), on the other hand, the purified rOBs produced by vAc6xHisPOLH-EDIIIYFV infection, showed a different aspect, resembling a protein mass (Figure 2B).

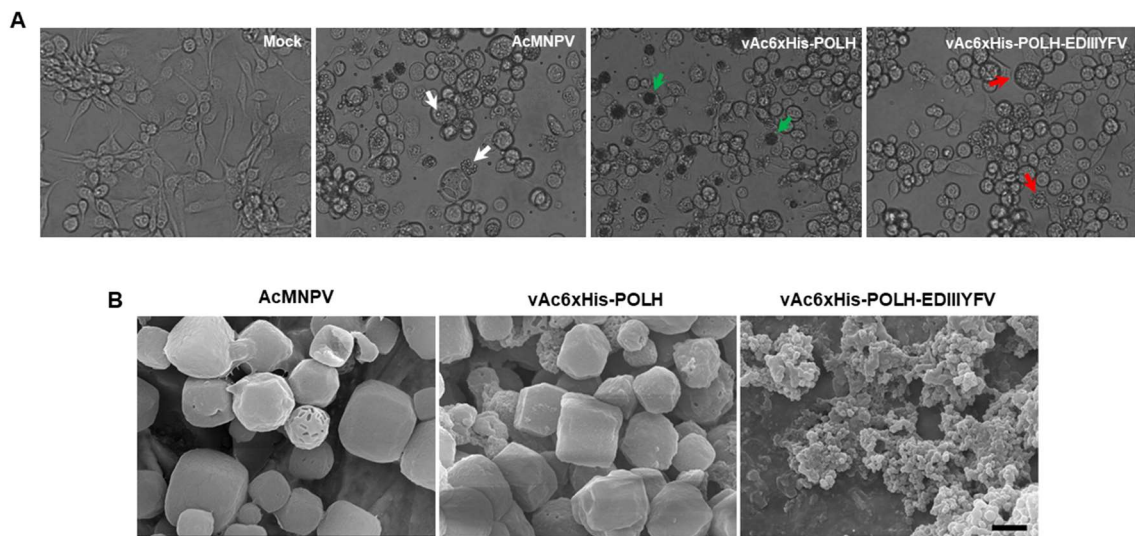


Figure 2. Light and scanning electron microscopy analysis of the 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV proteins. (A) Tn5B cells were infected with with MOI 1 of AcMNPV, vAc6xHis-POLH and vAc6xHis-POLH-EDIIIYFV, or mock-infected and analyzed under light microscope 72 h p.i. The cells infected with the AcMNPV (white arrows) and vAc6xHis-POLH (green arrows) presented a nuclear OB formation, and a very well distinguished cubic form, while the cells infected with the vAc6xHis-POLH-EDIIIYFV (red arrows) recombinant viruses, produced a cytoplasmic protein mass (B) The purified OBs or rOBs derived from cells infected with AcMNPV, vAc6xHis-POLH and vAc6xHis-POLH-EDIIIYFV were also analyzed under scanning electron microscope, confirming the similar OB conformation between AcMNPV and vAc6xHis-POLH and a protein mass for the vAc6xHis-POLH-EDIIIYFV rOBs. Scale bar = 1 μ m.

Mice immunization and lymphocyte proliferation analysis

To analyze the immunogenic potential of the rOBs, the BALB/c mice immunization was performed. Four treatments were used to immunize the animals (PBS; purified 6xHis-POLH, purified 6xHis-POLH-EDIIIYFV and 17DD yellow fever vaccine-Vac). After the immunization, the animals were sacrificed, the splenocytes collected. To analyze the sensitivity of the mice immune cells to the treatment, the splenocytes were treated with different stimuli *in vitro* (PBS; Con A, LPS, purified 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV) and the cell proliferation test performed (Figure 3A, B, C and D). Figure 3A shows the evaluation of lymphocytes proliferation from mice immunized with PBS (control). The result show that just the lymphocytes stimulated with Con A and LPS significantly proliferated (around 60% and

49%, respectively). This result is expected, since Con A is a known T cell mitogen capable of stimulating the proliferation of this type of cell. As well the LPS, a known B cell mitogen. Thus, the Con A and LPS were the proliferation positive controls of the experiment. The analyses of lymphocytes proliferation from animals immunized with the 17DD yellow fever vaccine (Figure 3B) showed interesting results. There was a clear proliferation of the lymphocytes when stimulated with the purified 6xHis-POLH-EDIIIYFV (25%) compared to those stimulated with 6xHis-POLH (5%). This result probably means that the EDIII epitope expressed in the rOB is being recognized by the immune cells. However, the results for the lymphocyte proliferation test from animals immunized with purified 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV showed similar results (Figure 3C and D). For animals immunized with purified 6xHis-POLH (Figure 3C) the percentage of lymphocyte proliferation was 24% for cells stimulated with 6xHis-POLH and 30% for cells stimulated with 6xHis-POLH-EDIIIYFV. For animals immunized with purified 6xHis-POLH-EDIIIYFV (Figure 3D) the percentage of lymphocyte proliferation was 16% for cells stimulated with 6xHis-POLH and 22% for cells stimulated with 6xHisPOLHEDIIIYFV. These results probably reflect an immune response against the POLH protein, present in both rOBs.

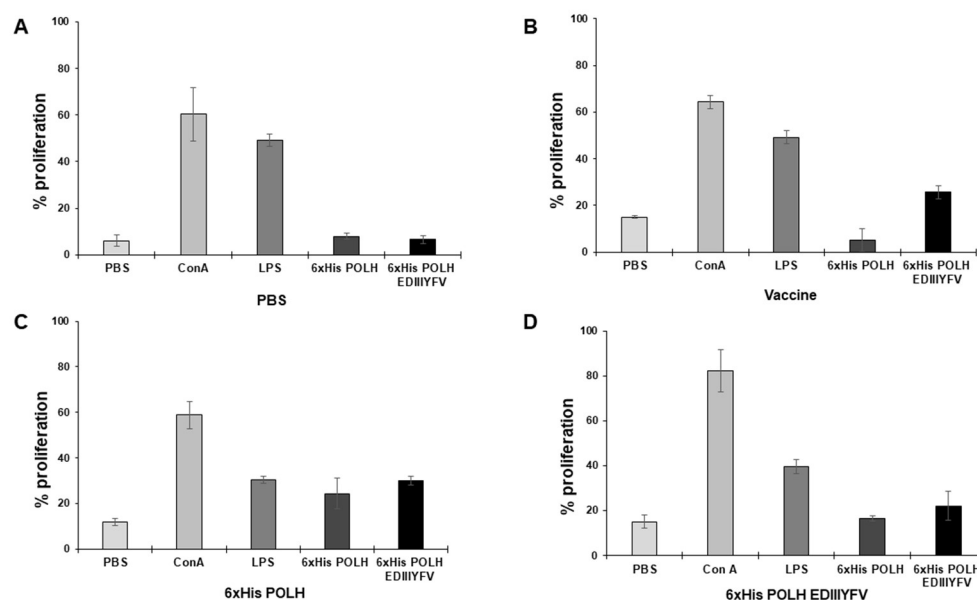


Figure 3. Effect of different stimuli on lymphocyte proliferation. Mice were immunized with PBS (A), 17DD strain yellow fever virus vaccine (Vac) (B), recombinant 6xHis-POLH rOBs (C) or 6xHis-POLH-EDIIIYFV rOBs (D). After three immunizations the animals were euthanized and the splenocytes collected. The splenocytes were treated with PBS, ConA (concanavalin A), LPS

(lipopolysaccharide), purified 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV OBs, and the potential of lymphocyte proliferation under different stimuli was evaluated by flow cytometer (FACSCalibur). Error bars represent standard deviation.

Production of IgG1 and IgG2a in immunized mice

To evaluate the type of immune response triggered by the mice immunization with the 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV proteins, the IgG1 and IgG2a antibodies production was analyzed. The production of the isotypes IgG1 and IgG2a in BALB/c mice are an indicative of Th1 or Th2 immune responses. The figure 4A shows similar production levels of IgG1 in groups immunized with YF vaccine, 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV compared to the control group. However, the production of the IgG1 in immunized groups was not very significant when compared to the production levels of IgG2a (Figure 4B). The levels of the IgG2a in YF vaccine, 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV groups were very similar and considerably higher compared to control group. A higher IgG2a/IgG1 ratio is associated with protective immune and indicating a dominant Th1 response.

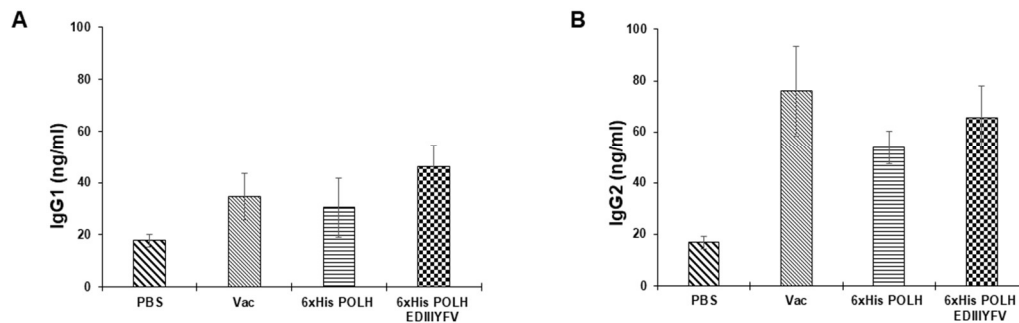


Figure 4. IgG1 and IgG2 isotype production analysis in the immunized mice serum. The levels of IgG1 and IgG2 in the serum of mice immunized with PBS, 17DD strain yellow fever virus vaccine, recombinant 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV OBs were evaluated. The results presented are average of three equal replicates and the error bars represent standard deviation.

Analysis of the immune response pathway in immunized mice

The immune response pathway triggered by the mice immunization with 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV proteins was evaluated by specific cytokine secretion assay. The splenocytes collected from mice immunized with PBS, Vac, 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV were incubated with the RPMI (negative control), Con A (positive control), 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV proteins as stimuli. After that, the IL-17, IFN- γ and TNF- α secretion levels were evaluated. The figure 5A shows the levels of IL-17 secretion in the four immunized groups after stimulation. The experiment showed that the cells from groups immunized with Vac, 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV induced IL-17 secretion when stimulated with 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV. The secretion of IL-17 is related to the Th17 pro-inflammatory immune response. As the IL-17 levels were high when cells were stimulated with both 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV stimuli, we believe that the immune response is specific to the POLH antigen and is due to the “adjuvant” role of this protein in the rOB.

The same experiment was performed to analyze the IFN- γ production (Figure 5B). In this experiment, we were able to see a significant difference in the IFN- γ production between the groups 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV. While the levels of IFN- γ were almost null in cells from animals immunized with 6xHis-POLH and stimulated with the same protein, the levels of IFN- γ production were expressive in cells from animals immunized with 6xHis-POLH-EDIIIYFV after all stimuli. That experiment corroborates the Th1 immune response indicated by the levels of IgG2a in the 6xHis-POLH-EDIIIYFV immunized mice serum. Lastly, was evaluated the levels of TNF- α as described above (Figure 6). The goal of that experiment was to analyze if the rOBs immunization of the mice could cause an inflammatory response able to elicit a humoral immune response. The results showed that the levels of TNF- α were high in animals immunized with both 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV in almost all stimuli, even compared to the TNF- α levels in the vaccine immunized group.

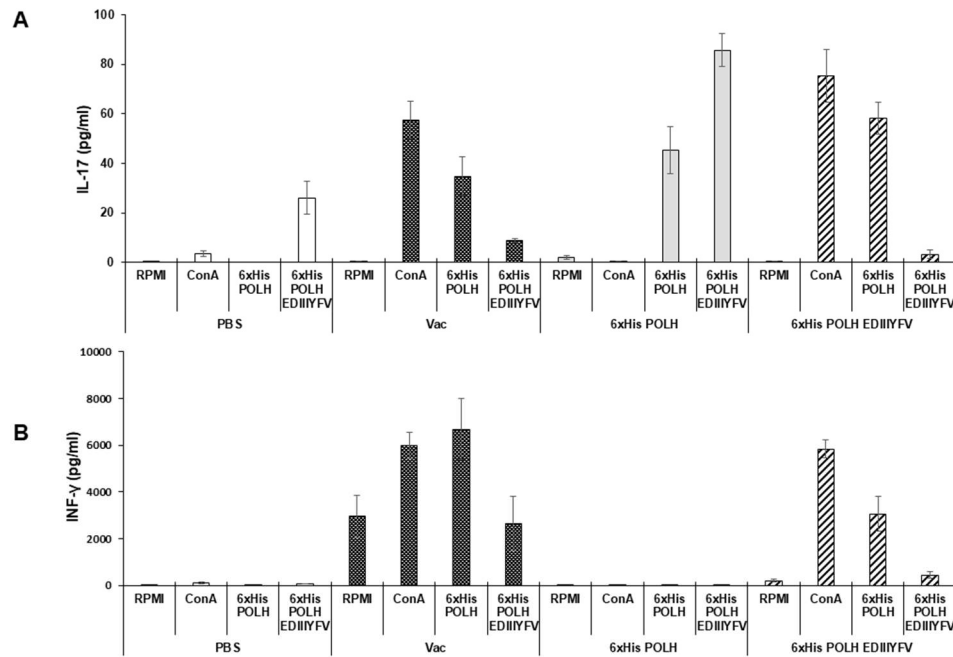


Figure 5. Cytokine production analysis in the supernatant of cultured splenocytes. The splenocytes from mice immunized with PBS, 17DD strain yellow fever virus vaccine (Vac), recombinant 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV OBs were collected and the supernatant analyzed for IL-17 and INF- γ levels production under different stimuli (RPMI, concanavalin A (ConA), 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV). The levels for IL-17 and INF- γ were analyzed by ELISA assay. The results presented are average of three equal replicates and the error bars represent standard deviation.

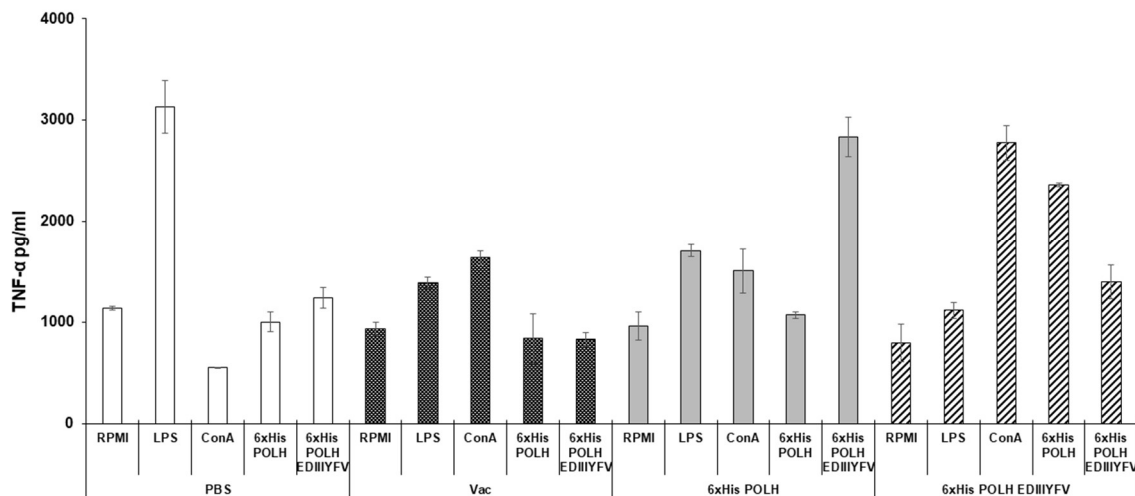


Figure 6. TNF- α production analysis in the supernatant of cultured splenocytes. The splenocytes from mice immunized with PBS, 17DD strain yellow fever virus vaccine (Vac), recombinant 6xHis-POLH or 6xHis-POLH-EDIIIYFV OBs were collected and the supernatant analyzed for TNF- α production under different stimuli (RPMI, concanavalin A (ConA), 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV). The level for TNF- α was analyzed by ELISA assay. The results presented are average of three equal replicates and the error bars represent standard deviation.

Discussion

Vaccination is the major preventive measure to establish specific immune defenses against infectious diseases [37]. The first generations of vaccines were based on attenuated or inactivated microorganisms. These kind of vaccines have proven extremely efficacy and, in some cases, have led to the complete eradication of the target pathogen (i.e. small pox) [38]. However, there are serious concerns associated to pathogens-based vaccines for immunization. It has been shown a considerable number of side effects related to vaccination for some types of vaccine, specially attenuated virus-based vaccines [39].

An example of an attenuated virus-based vaccine that has been extensively used is the 17DD vaccine against YF [40]. The 17DD vaccine is capable of inducing a long-term protective immune response with a single dose administration [41, 42]. This single dose is able to activate the immune system through the stimulation of cytotoxic T, Th1 and Th2 helper cells, besides inducing the production of neutralizing antibodies [43]. Thus, the

commercial available YF vaccine is efficient to conferring protection for more than 30 years [44].

Although the success of the YF vaccine in the prevention of the disease, the vaccine presents limitations that must be considered. Some limitation includes the increased number of adverse effects (allergies and hypersensitivity) in the YF vaccinated population [8, 9, 45]. Besides that, is important to highlight that the available vaccine is not recommended to people with immunodeficiency, individuals over 60 years age, pregnant or breastfeeding women since there are risks of reversion of virulence in a host with depression of the immune system [48, 49]. In addition, since the virus is cultured in chicken embryos, the vaccine may contain egg proteins, which may be harmful to people with hypersensitivity to egg proteins [49].

Recently, occurred a recurrence of the YF in Brazil (between 2016 and 2018) with more than 2,000 confirmed cases, including 500 deaths [49]. This data reassures the necessity of keep the efforts to produce a new kind of vaccine, which can reach a larger number of people. Moreover, a new generation vaccine could reduce the cost, time and need for special requirements during storage and distribution [50].

The subunit vaccines are vaccines that use specific antigenic peptides to trigger specific immune response [51]. It is well known that subunit vaccines are able to trigger strong and specific immune response. Thus, subunit vaccines are safer, cheaper and easy to produce compared to traditional vaccines (attenuated and/or inactivated) [52, 53]. As mentioned above, the available YF vaccine contains several limitations, and an alternative (subunit) vaccine could address these issues.

The BEVS is well characterized and extensively used for protein production *in vivo* and *in vitro* [54, 55]. Several proteins or immunogenic parts of proteins are being expressed using BEVS aiming the production of different types of vaccine [26, 56-58]. The use of BEVS to express heterologous proteins is very advantageous and different techniques can be applied to express the proteins of interest. The technique used in this work was the incorporation of the protein of interest into the baculovirus OB to create a rOB [30, 59, 60]. Therefore, some of these rOBs could be used as immunogens for vaccine development. Previously, it has been shown that rOBs carrying a HA peptide from influenza virus were able to trigger the production of specific antibodies in rabbits [61]. Besides that, the major advantage of this method is the high-level expression and the easy purification of rOB which, in most cases, forms an easily separated precipitated band by centrifugation on a sucrose gradient [24]. Moreover, when the BEVS is used to express antigenic epitopes, as the YFV EDIII, fused to the POLH protein, the

POLH can act like a built-in adjuvant, improving the immunogenicity of the epitope presented [62].

Based on that, we analyzed the type of immune response triggered by mice immunization with the 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV rOBs. This work was the first one to test the YFV EDIII fused to AcMNPV POLH as an immunogen in mice. Thus, all the protocols and features developed here could be improved hereafter. The fusion between YFV EDIII and AcMNPV POLH generated an uniform protein mass, differently from the know OB format found in the WT AcMNPV OB (Figure 2). Probably, this format is due to the extra amino acids present in the recombinant POLH, which changed the final protein folding. In future, we aim to test the expression of the EDIII sequence fused to the *polh* gene sequence in addition to an extra copy of the *polh* gene trying to address this issue. Despite that, the protein mass generated in this work was efficiently expressed and easily collected from expressing cells. During the experiments we realized that was no need of purification by sucrose gradient, mainly because of the difference in format and consistency of the rOB generated, only detergent washes were performed and the purification of the rOBs was satisfactory as showed in the microscopy experiments.

After expression, the rOBs were used to immunize mice, and the immune response evaluated. The results found in this work reveal similar levels of lymphocyte proliferation in the mice immunized with the 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV (Figure 3 C and D) under different stimuli. We believe that this result is due to the induction of immune response mediated by the POLH protein. Intra-nasal inoculation of baculovirus OBs in mice triggered an inflammatory immune response *in vivo*; and *in vitro* they were able to increase Th1 cell response, showing a potential to be used as an adjuvant in possible vaccines candidates [57]. An interesting result is showed in the Figure 3B, where we clearly can observe that the lymphocytes of mice immunized with the YF vaccine (17DD strain) are responding to the 6xHis-POLH-EDIIIYFV stimuli. This result confirms the EDIII epitope recognition among the rOB. Besides that, the Figure 4 revealed a higher titer of IgG2 compared to IgG1 antibody in the serum of animals immunized with the vaccine, 6xHis-POLH and 6xHis-POLH-EDIIIYFV. This result could be an indicative of the production of a specific immune response. Corroborating our results, levels of IL-17, INF- γ and TNF- α production under different stimuli to characterize the type of rOB-induced immune response (Figures 5 and 6). Based in all analysis, together, we consider that our strategy to present the YFV EDIII fused to POLH as an antigen, was able to trigger a Th1/Th17 immune response. Our finds are similar to a study that

evaluated the type of immune response triggered by mice immunized with a recombinant WNV EDIII protein expressed in plants. The results of the study showed that the immunization was able to elicit both IgG1 and IgG2a responses in mice, and other experiments indicated both Th1 and Th2-type immune responses activation [63]. Further, the plant-recombinant protein was able to protect mice against lethal WNV infection [64]. Based on that, the immune response triggered by our rOB immunization provides evidences of a specific activation of the immune system.

Conclusions

Although it is very clear that this strategy was efficient to lead an immune response against the recombinant OB, additional experiments should be performed in order to determine the efficiency of the method for a production of an alternative YV vaccine. We believe that this system has potential to be a platform of subunit vaccine development that can be improved and extended in the future.

Abbreviations

BEVS: Baculovirus Expression Vector System

DENV: Dengue Virus

E: Envelope protein

EDIII: Envelope protein Domain III

JEV: Japanese Encephalitis Virus

OB: Occlusion Body

POLH: Polyhedrin

Tn5B: *Trichoplusia ni* (cabbage looper) BTI-Tn5B1-4 cells

WNV: West Nile

YELAVD: Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease

YF: Yellow Fever

YFV: Yellow Fever Virus

ZIKV: Zika Virus

ODV: Occlusion Derived Virus

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The procedures were performed in accordance with the procedures accepted by the Ethics Committee in Animal Use by the University of Brasilia (CEUA / UnB no. 45/2017).

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

We thank Mrs. Tereza Luiza de Souza Pereira and Mrs. Maria Beatriz Ruy from the Brasilia City Secretary of Health for providing the Yellow Fever Vaccine sample.

Funding

This work was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, grant numbers 193.001532/2016 and 0193.000416/2016).

Authors' contributions

LCSC, MPDB and DMPAA carried out the baculovirus (protein expression) experiments and drafted the manuscript. CT performed the immunological analysis. ALB analyzed the results and edited the manuscript. DMPAA and BMR performed the microscopy experiments, analyzed the results and edited the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References

1. Monath TP, Vasconcelos PF: **Yellow fever**. *J Clin Virol* 2015, **64**:160-173.
2. Barrett AD, Monath TP: **Epidemiology and ecology of yellow fever virus**. *Adv Virus Res* 2003, **61**:291-315.
3. Gardner CL, Ryman KD: **Yellow fever: a reemerging threat**. *Clin Lab Med* 2010, **30**:237-260.
4. Simon LV, Torp KD: **Yellow Fever**. In *StatPearls*. Treasure Island (FL); 2017
5. **Yellow fever: fact sheet no. 100**, [<http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs100/en/>]
6. Paules CI, Fauci AS: **Yellow Fever - Once Again on the Radar Screen in the Americas**. *N Engl J Med* 2017, **376**:1397-1399.
7. Ferreira CC, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhaes V, Costa-Pereira C, Albuquerque CP, Muniz LF, Yokoy de Souza T, Oliveira ACV, Martins-Filho OA, da Mota LMH: **The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences**. *Expert Rev Vaccines* 2018, **17**:79-90.
8. Staples JE, Gershman M, Fischer M, Centers for Disease C, Prevention: **Yellow fever vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)**. *MMWR Recomm Rep* 2010, **59**:1-27.
9. Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VL, Monath TP, Rodrigues SG, Laval C, Costa ZG, et al: **Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases**. *Lancet* 2001, **358**:91-97.

10. Martin M, Tsai TF, Cropp B, Chang GJ, Holmes DA, Tseng J, Shieh W, Zaki SR, Al-Sanouri I, Cutrona AF, et al: **Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases.** *Lancet* 2001, **358**:98-104.
11. Galler R, Pugachev KV, Santos CL, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, Marchevsky RS, Freire MS, Almeida LF, Cruz AC, et al: **Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil.** *Virology* 2001, **290**:309-319.
12. Whitaker JA, Ovsyannikova IG, Poland GA: **Adversomics: a new paradigm for vaccine safety and design.** *Expert Rev Vaccines* 2015, **14**:935-947.
13. Nascimento IP, Leite LC: **Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies.** *Braz J Med Biol Res* 2012, **45**:1102-1111.
14. Liljeqvist S, Stahl S: **Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines.** *J Biotechnol* 1999, **73**:1-33.
15. Coconi-Linares N, Ortega-Davila E, Lopez-Gonzalez M, Garcia-Machorro J, Garcia-Cordero J, Steinman RM, Cedillo-Barron L, Gomez-Lim MA: **Targeting of envelope domain III protein of DENV type 2 to DEC-205 receptor elicits neutralizing antibodies in mice.** *Vaccine* 2013, **31**:2366-2371.
16. Vartak A, Sucheck SJ: **Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers.** *Vaccines (Basel)* 2016, **4**.
17. Lei Y, Zhao F, Shao J, Li Y, Li S, Chang H, Zhang Y: **Application of built-in adjuvants for epitope-based vaccines.** *PeerJ* 2019, **6**:e6185.
18. Zanutto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC: **Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:548-553.
19. Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijkman N, Rice CM, Spaan WJ: **A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication.** *J Gen Virol* 2003, **84**:1261-1268.
20. Fan J, Liu Y, Xie X, Zhang B, Yuan Z: **Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by flavivirus recombinant E protein domain III.** *Virol Sin* 2013, **28**:152-160.
21. Guzman MG, Hermida L, Bernardo L, Ramirez R, Guillen G: **Domain III of the envelope protein as a dengue vaccine target.** *Expert Rev Vaccines* 2010, **9**:137-147.
22. Martina BE, Koraka P, van den Doel P, van Amerongen G, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD: **Immunization with West Nile virus envelope domain III protects mice against lethal infection with homologous and heterologous virus.** *Vaccine* 2008, **26**:153-157.
23. Ramasamy V, Arora U, Shukla R, Poddar A, Shanmugam RK, White LJ, Mattocks MM, Raut R, Perween A, Tyagi P, et al: **A tetravalent virus-like particle vaccine designed to display domain III of dengue envelope proteins induces multi-serotype neutralizing antibodies in**

- mice and macaques which confer protection against antibody dependent enhancement in AG129 mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2018, **12**:e0006191.
24. O'REILLY DRM, L. K.; LUCKOW, V. A: *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. New York: W.H. Freeman and Company; 1992.
 25. Hitchman RB, Possee RD, King LA: **Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells**. *Recent Pat Biotechnol* 2009, **3**:46-54.
 26. Kost TA, Kemp CW: **Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications**. *Adv Exp Med Biol* 2016, **896**:187-197.
 27. Felberbaum RS: **The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors**. *Biotechnol J* 2015, **10**:702-714.
 28. Rohrmann GF: In *Baculovirus Molecular Biology*. Edited by rd. Bethesda (MD); 2013
 29. Je YH, Jin BR, Park HW, Roh JY, Chang JH, Seo SJ, Olszewski JA, O'Reilly DR, Kang SK: **Baculovirus expression vectors that incorporate the foreign protein into viral occlusion bodies**. *Biotechniques* 2003, **34**:81-87.
 30. Ardisson-Araujo DM, Rocha JR, da Costa MH, Bocca AL, Dusi AN, de Oliveira Resende R, Ribeiro BM: **A baculovirus-mediated strategy for full-length plant virus coat protein expression and purification**. *Virol J* 2013, **10**:262.
 31. Lopez MG, Diez M, Alfonso V, Taboga O: **Biotechnological applications of occlusion bodies of Baculoviruses**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018.
 32. Granados RR GL, Derksen ACG, Mckenna KA: **A new insect cell line from Trichoplusia ni (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to Trichoplusia ni single enveloped nucleopolyhedrosis virus**. *Journal of Invertebrate Pathology* 1994, **64**:260-266.
 33. Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO: **Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli**. *J Virol* 1993, **67**:4566-4579.
 34. Lee HH, Miller LK: **Isolation of genotypic variants of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus**. *J Virol* 1978, **27**:754-767.
 35. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 1970, **227**:680-685.
 36. Quah BJ, Parish CR: **The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation**. *J Vis Exp* 2010.
 37. Shams H: **Recent developments in veterinary vaccinology**. *Vet J* 2005, **170**:289-299.
 38. Smith KA: **Edward Jenner and the small pox vaccine**. *Front Immunol* 2011, **2**:21.
 39. Plotkin SA: **Vaccines: past, present and future**. *Nat Med* 2005, **11**:S5-11.
 40. Marchevsky RS, da Luz Leal M, Homma A, Coutinho ES, Camacho LA, Jabor AV, Galler R, Freire MS: **Molecular and phenotypic analysis of a working seed lot of yellow fever virus**

- 17DD vaccine strain produced from the secondary seed lot 102/84 with an additional passage in chicken embryos.** *Biologicals* 2006, **34**:191-197.
41. Monath TP, Cetron MS, McCarthy K, Nichols R, Archambault WT, Weld L, Bedford P: **Yellow fever 17D vaccine safety and immunogenicity in the elderly.** *Hum Vaccin* 2005, **1**:207-214.
 42. World Health O: **Yellow fever vaccine. WHO position paper.** *Wkly Epidemiol Rec* 2003, **78**:349-359.
 43. Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'Age-Stehr J: **Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection.** *J Med Virol* 1998, **56**:159-167.
 44. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K: **Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine.** *Bull World Health Organ* 1981, **59**:895-900.
 45. Monath TP: **Treatment of yellow fever.** *Antiviral Res* 2008, **78**:116-124.
 46. Vasconcelos PF: **[Yellow Fever].** *Rev Soc Bras Med Trop* 2003, **36**:275-293.
 47. Rubin LG, Levin MJ, Ljungman P, Davies EG, Avery R, Tomblyn M, Bousvaros A, Dhanireddy S, Sung L, Keyserling H, et al: **2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host.** *Clin Infect Dis* 2014, **58**:309-318.
 48. Chernin LR, Swender D, Hostoffer RW, Jr.: **Cracking the shell on egg-hypersensitive patients and egg-containing vaccines.** *J Am Osteopath Assoc* 2011, **111**:S5-6.
 49. Barrett ADT: **The reemergence of yellow fever.** *Science* 2018, **361**:847-848.
 50. Demento SL, Siefert AL, Bandyopadhyay A, Sharp FA, Fahmy TM: **Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines.** *Trends Biotechnol* 2011, **29**:294-306.
 51. Moyle PM, Toth I: **Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities.** *ChemMedChem* 2013, **8**:360-376.
 52. Skwarczynski M, Toth I: **Recent advances in peptide-based subunit nanovaccines.** *Nanomedicine (Lond)* 2014, **9**:2657-2669.
 53. Foged C: **Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems.** *Ther Deliv* 2011, **2**:1057-1077.
 54. Emery VC: **Baculovirus expression vectors.** *Methods Mol Biol* 1992, **8**:319-326.
 55. Yee CM, Zak AJ, Hill BD, Wen F: **The Coming Age of Insect Cells for Manufacturing and Development of Protein Therapeutics.** *Ind Eng Chem Res* 2018, **57**:10061-10070.
 56. Kim HJ, Son HS, Lee SW, Yoon Y, Hyeon JY, Chung GT, Lee JW, Yoo JS: **Efficient expression of enterovirus 71 based on virus-like particles vaccine.** *PLoS One* 2019, **14**:e0210477.

57. Zhang H, Wen W, Hao G, Chen H, Qian P, Li X: **A Subunit Vaccine Based on E2 Protein of Atypical Porcine Pestivirus Induces Th2-type Immune Response in Mice.** *Viruses* 2018, **10**.
58. Dai S, Zhang T, Zhang Y, Wang H, Deng F: **Zika Virus Baculovirus-Expressed Virus-Like Particles Induce Neutralizing Antibodies in Mice.** *Virol Sin* 2018, **33**:213-226.
59. Diez M TM, Alfonso V, Taboga O, López MG.: **Recombinant occlusion bodies of baculovirus as carriers of a non-structural protein of foot-and-mouth disease virus.** *3 Biotech* 2018, **8**:457.
60. Lopez MG, Diez M, Alfonso V, Taboga O: **Biotechnological applications of occlusion bodies of Baculoviruses.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2018, **102**:6765-6774.
61. McLinden JH, Ploplis VA, Fraser MJ, Rosen ED: **Expression of foreign epitopes on recombinant occlusion bodies of baculoviruses.** *Vaccine* 1992, **10**:231-237.
62. Bocca AL, Barros MC, Martins GK, de Araujo AC, Souza MJ, Ribeiro AM, Figueiredo F, Ribeiro BM: **Immunological effects of Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) by stimulation of mice in vivo and in vitro.** *Virus Res* 2013, **176**:119-127.
63. He J, Peng L, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, Chen Q: **A plant-produced antigen elicits potent immune responses against West Nile virus in mice.** *Biomed Res Int* 2014, **2014**:952865.
64. Lai H, Paul AM, Sun H, He J, Yang M, Bai F, Chen Q: **A plant-produced vaccine protects mice against lethal West Nile virus infection without enhancing Zika or dengue virus infectivity.** *Vaccine* 2018, **36**:1846-1852.

